

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS,
ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DEL
RECEPTOR PARA INMUNOGLOBULINA A
EN LAS CELULAS MESANGIALES

Director: Dr. Jesús Egido de los Ríos

TESIS DOCTORAL
Carmen Gómez Guerrero
1994



Fundación Jiménez Díaz

CLÍNICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCIÓN

Avenida de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)
28040 - MADRID

TELÉFONOS
544 16 00 - 544 91 00
549 10 07 - 549 11 00

Don Jesús Egido de los Ríos, Doctor en Medicina y Profesor Titular de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA

Que Doña Carmen Gómez Guerrero, Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección las experiencias necesarias para la realización de la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmo la presente en Madrid, a 4 de Mayo de 1994.

Fdo. Director: Dr. Jesús Egido de los Ríos

Fdo. Tutor: Carmen Acebal

Fdo. Doctorando: Carmen Gómez Guerrero

A Alois, come todo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el Laboratorio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, bajo la dirección del Dr. Jesús Egido de los Ríos. Quisiera darle las gracias, en primer lugar, por haberme dado la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación, y en segundo lugar, por la orientación y dirección científica que me ha prestado.

A los Drs. Luis Hernando Avendaño y Santos Casado, Jefes sucesivos del Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, por su apoyo al trabajo científico desarrollado en el laboratorio.

Al Dr. Fernando Ortiz Masllorens, Jefe del Servicio de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz, y al Dr. Fernando Vivanco, por las críticas y estimulantes observaciones que han aportado a mi trabajo investigador.

Al Dr. Carlos Caramelo y a su grupo de investigación en el Laboratorio de Nefrología, por poner a mi alcance parte del material y de los conocimientos de que disponen.

A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, por la concesión de la beca que me ha permitido llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

Asimismo, quisiera dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio, que con su ayuda han contribuido a que este trabajo haya salido adelante:

A Eva González, por su constante ayuda científica, sus buenos consejos y su estímulo incondicional en los malos momentos.

A Jesús González, uno de mis primeros maestros en el laboratorio, por sus enseñanzas y consejos y su ejemplo de cómo se debe trabajar en un laboratorio.

A Carmen B., Carolina, Mar, Mabel y Benito quisiera darles las gracias por la amistad que me han brindado en todo momento, por los buenos y malos ratos que hemos pasado juntos, por sus consejos, por tantos cafés,...en fin, por casi todo, compañeros.

Al resto de los compañeros con los que he compartido el trabajo investigador durante estos años. Algunos ya no están en el laboratorio (Ana, Paloma, Javier), otros marcharon al extranjero (Marta) y otros continúan (Martita, Silvia, Mariajo, Rosario, Javi, Itziar, Mónica, Miguel Angel, Raquel, Sylvia y Maritina). Gracias por vuestra ayuda y compañerismo.

A Toño y Alois, por su colaboración en la presentación de esta tesis doctoral.

Finalmente quisiera dar las gracias a mi familia, por el cariño que siempre me han demostrado, por la paciencia que han tenido en el transcurso de mi tarea investigadora y por la firme confianza que siempre han depositado en mí, alentándome día a día para conseguir que, por fin, acabara de escribir estas páginas.

RESUMEN

El daño glomerular progresivo es la principal causa de insuficiencia renal y puede producirse como consecuencia del depósito en el glomérulo de componentes biológicamente activos, entre los que destacan los inmunocomplejos. Dentro del glomérulo, el mesangio, formado por células mesangiales y matriz extracelular, ocupa una posición central en la estructura y participa de forma activa y muy importante en su funcionalidad. Estudios previos han demostrado que las células mesangiales poseen un receptor específico para IgG, cuyas características bioquímicas son análogas a las de los receptores Fc γ descritos en otras células macrofágicas. La unión y posterior endocitosis de los inmunocomplejos de IgG a través de estos receptores produce una rápida activación de las células mesangiales, que liberan diversos mediadores de la inflamación. Estudios en nuestro laboratorio han mostrado que la interacción entre las células mesangiales y los inmunocomplejos de IgA induce la liberación de ión superóxido, PAF y eicosanoides, pero hasta el momento no se han determinado las características bioquímicas, moleculares y funcionales de los posibles receptores para IgA en estas células.

Los resultados que se exponen en esta tesis doctoral demuestran que en la célula mesangial existe un receptor específico para IgA, capaz de unir con alta afinidad esta inmunoglobulina a través de la región Fc. Este receptor puede ser incluido en la familia de los receptores Fc α , pues presenta ciertas analogías con los receptores Fc α descritos en otros tipos de células. Los carbohidratos contenidos en la estructura de la IgA participan de forma muy importante en dicha interacción. Demostramos además algunos aspectos funcionales que ocurren después de la ocupación de los receptores de la membrana celular por la IgA, como los fenómenos de endocitosis y degradación de IgA, y la activación de los procesos de transducción de la señal (incremento del calcio intracelular), proliferación mesangial y liberación de citocinas (factor de necrosis tumoral e interleucina 6).

Con este trabajo se aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos patogénicos que provocan daño tisular en algunas enfermedades, como la nefropatía IgA, una de las glomerulonefritis más comunes en el mundo, caracterizada por el depósito de inmunocomplejos de IgA en el mesangio. La interacción de estos inmunocomplejos con las células mesangiales provoca su activación y la consiguiente liberación de mediadores proinflamatorios, participando así activamente en la progresión del daño glomerular.

ABREVIATURAS

Alg	Agregados solubles de inmunoglobulinas
AII	Angiotensina II
ANP	Péptido natriurético atrial
ASG	Asialoglicoproteína
ASOR	Asialoorosomucoide
bFGF	Factor de crecimiento para fibroblastos básico
BSA	Albúmina de suero bovino
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
CHX	Cicloheximida
C_{L(II)}, V_{L(II)}	Dominio de la región constante o variable de la cadena ligera (pesada) de una inmunoglobulina
CSF-1	Factor estimulador de colonias-1
DEAE	Dietilaminoetil
desIgA	IgA parcialmente desializada
DG	Diacilglicerol
DNA	Acido desoxirribonucleico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EDTA	Acido etilendiamino treaacético
EGTA	Acido etilenglicol-bis-(β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
ET	Endotelina
F(ab)	Región variable de una inmunoglobulina
Fc(α, γ)	Región constante de una inmunoglobulina (A, G)
Gal	β-D-galactosa
GalNAc	β-D-N-acetilgalactosamina
GlcNAc	β-D-N-acetilglucosamina
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos/monocitos
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico
ICAM-1	Molécula intracelular de adhesión 1
IFN-γ	Interferón-γ

Ig	Inmunoglobulina (A, G, M, E, D)
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
IL	Interleucina
IP₃	Inositol trifosfato
IP-10	Proteína inducible por interferón 10
K_a	Constante de afinidad
K_d	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
kb	Kilobase
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LT	Leucotrieno
MCP-1	Proteína quimiotáctica para monocitos 1
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
NO	Oxido nítrico
NGF	Factor de crecimiento nervioso
PAF	Factor activador de plaquetas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
SC	Componente secretorio
SDS	Dodecil sulfato sódico
STF	Suero de ternera fetal
TCA	Acido tricloroacético
TMB-8	8-(N,N-dietilamino)octil 3,4,5-trimetoxibenzoato
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tx	Tromboxano

INDICE

I.- INTRODUCCION	1
1.- ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA INMUNOGLOBULINA A	1
1.1.- GENERALIDADES	1
1.2.- ESTRUCTURA DE LA IgA	2
1.3.- FUNCIONES DE LA IgA	7
1.4.- RECEPTORES DE IgA	9
1.4.1.- Receptor de inmunoglobulinas poliméricas	9
1.4.2.- Receptores para los carbohidratos de la IgA	10
1.4.3.- Receptor para la región constante de la IgA	11
1.4.3.a.- Receptores en células fagocíticas	12
1.4.3.b.- Receptores en linfocitos	14
1.4.3.c.- Receptores en bacterias	15
2.- MESANGIO Y ENFERMEDAD GLOMERULAR	16
2.1.- ESTRUCTURA DEL MESANGIO	16
2.2.- FUNCIONES DE LA CELULA MESANGIAL	18
2.2.1.- Control de la filtración glomerular	19
2.2.2.- Capacidad fagocítica	19
2.2.3.- Proliferación mesangial	20
2.2.4.- Producción de mediadores de la inflamación	22

2.3.- MECANISMOS DE PRODUCCION DE LA	
LESION GLOMERULAR	23
2.3.1.- Patología del mesangio	24
3.- PARTICIPACION DE ALGUNOS MEDIADORES	
EN EL DAÑO GLOMERULAR	26
3.1.- FACTOR DE NECROSIS TUMORAL	26
3.1.1.- Aspectos generales	26
3.1.2.- TNF α en el mesangio	28
3.2.- INTERLEUCINA 6	30
3.2.1.- Aspectos generales	30
3.2.2.- IL-6 en el mesangio	31
4.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LA NEFROPATIA IgA	32
4.1.- ASPECTOS CLINICOS	32
4.2.- ASPECTOS INMUNOPATOLOGICOS	33
4.2.1.- Anomalías en el sistema inmune	33
4.2.2.- Anomalías en el riñón	34
 II.- OBJETIVOS	 37
 III.- MATERIALES Y METODOS	 39
1.- REACTIVOS	39
2.- TAMPONES Y SOLUCIONES	43

3.- METODOS EXPERIMENTALES	48
3.1.- CULTIVOS CELULARES	48
3.1.1.- Cultivo de células mesangiales de rata	48
3.1.2.- Cultivo de células mesangiales humanas	49
3.1.3.- Caracterización de las células mesangiales	49
3.1.4.- Aislamiento de macrófagos peritoneales de rata	51
3.2.- AISLAMIENTO DE PROTEINAS	51
3.2.1.- Técnicas generales	51
3.2.1.a.- Inmunodifusión doble dimensional	51
3.2.1.b.- Inmunoelectroforesis	51
3.2.1.c.- Electroforesis en geles de poliacrilamida	52
3.2.1.d.- Unión de proteínas a Sepharosa	53
3.2.1.e.- Marcaje de proteínas por el método de la cloramina T	54
3.2.2.- Aislamiento de inmunoglobulinas	54
3.2.2.a.- Aislamiento de IgM	54
3.2.2.b.- Aislamiento de IgA	54
3.2.2.c.- Preparación de agregados de un tamaño definido	58
3.2.2.d.- Desialización de proteínas	59

3.3.- ENSAYOS DE UNION Y CATABOLISMO	
DE PROTEINAS MARCADAS	60
3.3.1.- Unión de proteínas marcadas a	
células mesangiales	60
3.3.2.- Cálculo de la constante de equilibrio	61
3.3.3.- Ensayos de inhibición	62
3.3.4.- Catabolismo de las proteínas marcadas	62
3.4.- AISLAMIENTO DE LOS RECEPTORES DE IgA	
DE CELULAS MESANGIALES	63
3.4.1.- Obtención de membranas celulares marcadas	63
3.4.2.- Aislamiento de los receptores de IgA	64
3.5.- AISLAMIENTO DE RNA Y TECNICAS DE HIBRIDACION	65
3.5.1.- Preparación de las sondas y marcaje	65
3.5.2.- Extracción de RNA y cuantificación	66
3.5.3.- Northern blot	67
3.5.4.- Prehibridación e hibridación	67
3.6.- MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE	
CALCIO INTRACELULAR	68
3.7.- DETERMINACION Y CARACTERIZACION DE CITOCINAS	70
3.7.1.- Estimulación de las células mesangiales para la	
producción de citocinas	70
3.7.2.- Determinación de $\text{TNF}\alpha$	70
3.7.3.- Determinación de IL-6	71
3.7.4.- Especificidad de los ensayos de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6	72

3.8.- ENSAYOS DE PROLIFERACION DE	
CELULAS MESANGIALES	73
3.8.1.- Medida de la incorporación de [³ H]timidina	73
3.8.2.- Ensayo colorimétrico del azul de metileno	74
3.9.- ANALISIS ESTADISTICO	75
IV.- RESULTADOS	76
1.- CARACTERIZACION DE LA UNION DE IgA A LAS	
CELULAS MESANGIALES	76
1.1.- ESTUDIOS DE UNION	76
1.1.1.- Unión de la IgA a las células mesangiales	76
1.1.1.a.- Cinética de la unión de la IgA	76
1.1.1.b.- Constante de afinidad y número	
de sitios para IgA	77
1.1.1.c.- Especificidad de la unión de la IgA a las	
células mesangiales	79
1.1.1.d.- Unión de la IgA a otros tipos de células	81
1.1.1.e.- Inhibiciones de la unión de IgA	
con carbohidratos	84

1.1.2.- Unión de la IgA desializada a las células mesangiales	86
1.1.2.a.- Constante de afinidad y número de sitios para desIgA	86
1.1.2.b.- Especificidad de la unión de desIgA a las células mesangiales	87
1.1.2.c.- Inhibición de la unión de desIgA con carbohidratos	89
1.1.3.- Unión de asialoorosomucoide a las células mesangiales	91
1.1.3.a.- Constante de afinidad y número de sitios para ASOR	92
1.1.3.b.- Especificidad de la unión de ASOR a las células mesangiales	93
1.1.3.c.- Inhibición de la unión de ASOR con galactosa	94
1.1.3.d.- Inhibiciones cruzadas entre IgA, desIgA y ASOR	95
1.2.- AISLAMIENTO DE LOS RECEPTORES DE IgA EN LAS CELULAS MESANGIALES	97
1.2.1.- Purificación de los receptores de la membrana celular	97
1.2.2.- Especificidad del receptor para IgA	100
1.2.3.- Modulación de la expresión del receptor de IgA	102
1.3.- EXPRESION DEL mRNA DEL RECEPTOR DE IgA	104
1.3.1.- Hibridación del mRNA con la sonda pHuFc α R	104
1.3.2.- Regulación de la expresión del mRNA del receptor de IgA	105

2.- ESTUDIOS FUNCIONALES DEL RECEPTOR DE IgA EN	
LAS CELULAS MESANGIALES	107
2.1- CATABOLISMO DE LAS PROTEINAS	107
2.1.1.- Unión, internalización y degradación de IgA, desIgA e IgG por las células mesangiales de rata	108
2.1.2.- Catabolismo dependiente de la región Fc de la IgA y de la concentración de calcio en el medio	112
2.1.3.- Estudios comparativos en otros tipos de células	114
2.2.- VARIACIONES EN LA CONCENTRACION DE CALCIO	
INTRACELULAR EN LAS CELULAS MESANGIALES	116
2.2.1.- Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la IgA	116
2.2.2.- Factores que intervienen en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$	119
2.2.2.a.- Contribución del calcio extracelular	120
2.2.2.b.- Liberación del calcio de los depósitos intracelulares	121
2.2.2.c.- Efecto de la toxina de pertussis y de la estaurosporina	122
2.3.- PRODUCCION DE CITOCINAS POR	
LAS CELULAS MESANGIALES	124
2.3.1.- Producción de $TNF\alpha$	124
2.3.1.a.- Medida de la actividad biológica del $TNF\alpha$	124
2.3.1.b.- Especificidad del $TNF\alpha$	129
2.3.1.c.- Expresión del mRNA del $TNF\alpha$	130

2.3.2.- Producción de IL-6	132
2.3.2.a.- Medida de la actividad biológica de la IL-6	132
2.3.2.b.- Especificidad de la IL-6	137
2.3.2.c.- Expresión del mRNA de la IL-6	138
2.4.- PROLIFERACION DE LAS CELULAS MESANGIALES	140
2.4.1.- Medida de la proliferación por incorporación de [³ H]timidina	140
2.4.2.- Medida de la proliferación por captación de azul de metileno	142
2.4.3.- Factores implicados en la proliferación de las células mesangiales	144
 V.- DISCUSION	 146
1.- CARACTERIZACION DE LA UNION DE LA IgA A LAS CELULAS MESANGIALES	147
1.1.- INTERACCIONES ENTRE LA IgA Y LAS CELULAS MESANGIALES	147
1.2.- AISLAMIENTO DEL RECEPTOR PARA IgA Y EXPRESION DE mRNA EN CELULAS MESANGIALES	151
1.2.1.- Receptores de la membrana de las células mesangiales	151
1.2.2.- Expresión del mRNA del receptor de IgA	154
1.3.- PAPEL DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA INTERACCION ENTRE LA IgA Y LAS CELULAS MESANGIALES	156

2.- ASPECTOS FUNCIONALES DEL RECEPTOR DE IgA	
EN LAS CELULAS MESANGIALES	159
2.1.- UNION, INTERNALIZACION Y DEGRADACION	
DE IgA POR LAS CELULAS MESANGIALES	160
2.2.- MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE LA	
SEÑAL INTRACELULAR	163
2.3.- PRODUCCION DE CITOCINAS POR LAS	
CELULAS MESANGIALES	166
2.4.- PROLIFERACION MESANGIAL	169
 VI.- CONCLUSIONES	 171
 VII.- BIBLIOGRAFIA	 173

I.- INTRODUCCION

1.- ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA INMUNOGLOBULINA A:

1.1.- GENERALIDADES:

En 1959 Heremans aisló la inmunoglobulina A (IgA) del suero humano por vez primera. Más tarde, en 1963, fueron Tomasi y Sigelbaum los que encontraron a la IgA como inmunoglobulina predominante en las secreciones humanas (calostro, leche, saliva, lágrimas y secreciones del tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario) [1].

Se han identificado dos subclases o **isotipos** de IgA: IgA1 e IgA2. La IgA1 representa un 80-90% de la IgA sérica total y un 50-74% de la de las secreciones. Las células IgA1 positivas se encuentran predominantemente en el bazo, amígdalas, médula ósea y varios nódulos linfoides, mientras que la mucosa intestinal y las glándulas salivales y lacrimales contienen prácticamente el mismo número de células IgA1 e IgA2 positivas. La vida media de ambas IgA1 e IgA2 se sitúa entre 4 y 6 días [2]. Sólo se ha demostrado polimorfismo genético en la subclase IgA2. Así, este isotipo posee dos **variantes alotípicos**, designados A2m(1) y A2m(2) [3].

Existen tres **formas moleculares** diferentes para la IgA: IgA monomérica, compuesta por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, IgA dimérica y polimérica, compuestas respectivamente por dos o más moléculas unidas covalentemente a través de la cadena J, y la IgA secretoria, formada por la IgA dimérica o polimérica que se unen covalentemente al componente secretorio [1, 4].

La IgA es la segunda inmunoglobulina más importante en la circulación, después de la inmunoglobulina G (IgG). El grado de **síntesis** está en el mismo orden de magnitud que la IgG, es decir, 19-30 mg/kg/día para IgA y 30 mg/kg/día para IgG. En estudios posteriores se ha determinado que la síntesis combinada de IgA sistémica y secretoria es de aproximadamente 60 mg/kg/día. Por estas razones puede considerarse a la IgA como la inmunoglobulina predominante producida en humanos [1, 2].

A pesar de su abundancia, se conoce relativamente poco acerca de las **funciones** de la IgA. Recientemente ha resurgido el estudio inmunológico de estas proteínas, gracias a la caracterización bioquímica de las diferentes formas de la IgA, al desarrollo de los métodos

de purificación y a la disponibilidad de anticuerpos monoclonales frente a los distintos isotipos. Todas las investigaciones realizadas en los últimos años han hecho pensar en la IgA como en una molécula con un papel en la inmunidad más activo del que previamente se había considerado. Por otro lado, se han detectado niveles elevados de IgA sérica en muchas enfermedades reumáticas y en otras de carácter autoinmune, así como en enfermedades hepáticas e infecciones persistentes, tales como endocarditis bacteriana y SIDA [5]. Algunos estudios han demostrado que los inmunocomplejos de IgA pueden estar implicados en la patogenia de una gran variedad de enfermedades, entre las que se incluye la nefropatía IgA, una causa bastante común de insuficiencia renal [6].

1.2.- ESTRUCTURA DE LA IgA:

La IgA está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (llamadas α) y dos ligeras (de tipo kappa o lambda). Los genes que codifican dichas cadenas están situados en los cromosomas 14, 2 y 22, respectivamente [7]. Las **cadenas ligeras** son análogas a las de otros tipos de inmunoglobulinas y están formadas por un dominio variable (V_L) y otro constante (C_L). La **cadena pesada** α posee una masa molecular aproximada de 60kDa, superior a la IgG, debido a su mayor grado de glicosilación y está compuesta por cuatro dominios, uno variable (V_H) y tres constantes (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}) [8].

La IgA carece casi totalmente de estructura helicoidal y por microscopía electrónica se ha observado que tiene la misma forma de Y aplanada y las mismas medidas que la IgG [9]. Es la inmunoglobulina con mayor movilidad electroforética y su contenido en aminoácidos es similar al de la IgG, exceptuando la baja cantidad de Lys y el elevado número de Cys. El coeficiente de extinción a 280 nm para la IgA es $E1\% = 13.4$ [1].

La **IgA monomérica** es la principal forma molecular en el suero humano, con 160 kDa de masa molecular y un coeficiente de sedimentación entre 6,5 y 7S. La secuencia de aminoácidos de la IgA de ratón y de conejo presenta un 50% de homología con la IgA humana [8]. Aunque todos los puentes disulfuro intradominio parecen estar conservados, algunas Cys, probablemente las implicadas en los puentes disulfuro intercadena, no aparecen. En general, en la IgA1 las cadenas pesadas se unen por puentes disulfuro entre

los dominios C_H2, C_H3 y la región bisagra [10]. El extremo C-terminal de la cadena α posee una ampliación de 18 aminoácidos que no posee el resto de las cadenas pesadas. El penúltimo de estos residuos es una Cys que puede formar puentes disulfuro con una Cys de la otra cadena α o, en ocasiones, con una Cys de una proteína no perteneciente a la clase de las inmunoglobulinas, por ejemplo, albúmina o α_1 -antitripsina [8, 11].

Las cadenas pesadas de las dos formas isotípicas **IgA1 e IgA2** difieren solamente en 22 aminoácidos, debido predominantemente a una delección de 13 aminoácidos en la región bisagra de la IgA2. Esta región en la IgA1 está compuesta por una inusual repetición de una secuencia rica en Pro, Ser y Thr. Los residuos de Ser llevan azúcares unidos por enlaces O-glicosídicos. La pérdida de esta región en la IgA2 es la causa de su gran resistencia a la acción de un gran número de proteasas bacterianas, que sí son capaces de actuar sobre la IgA1. Este hecho está muy relacionado con la patogenicidad de las bacterias [11, 12].

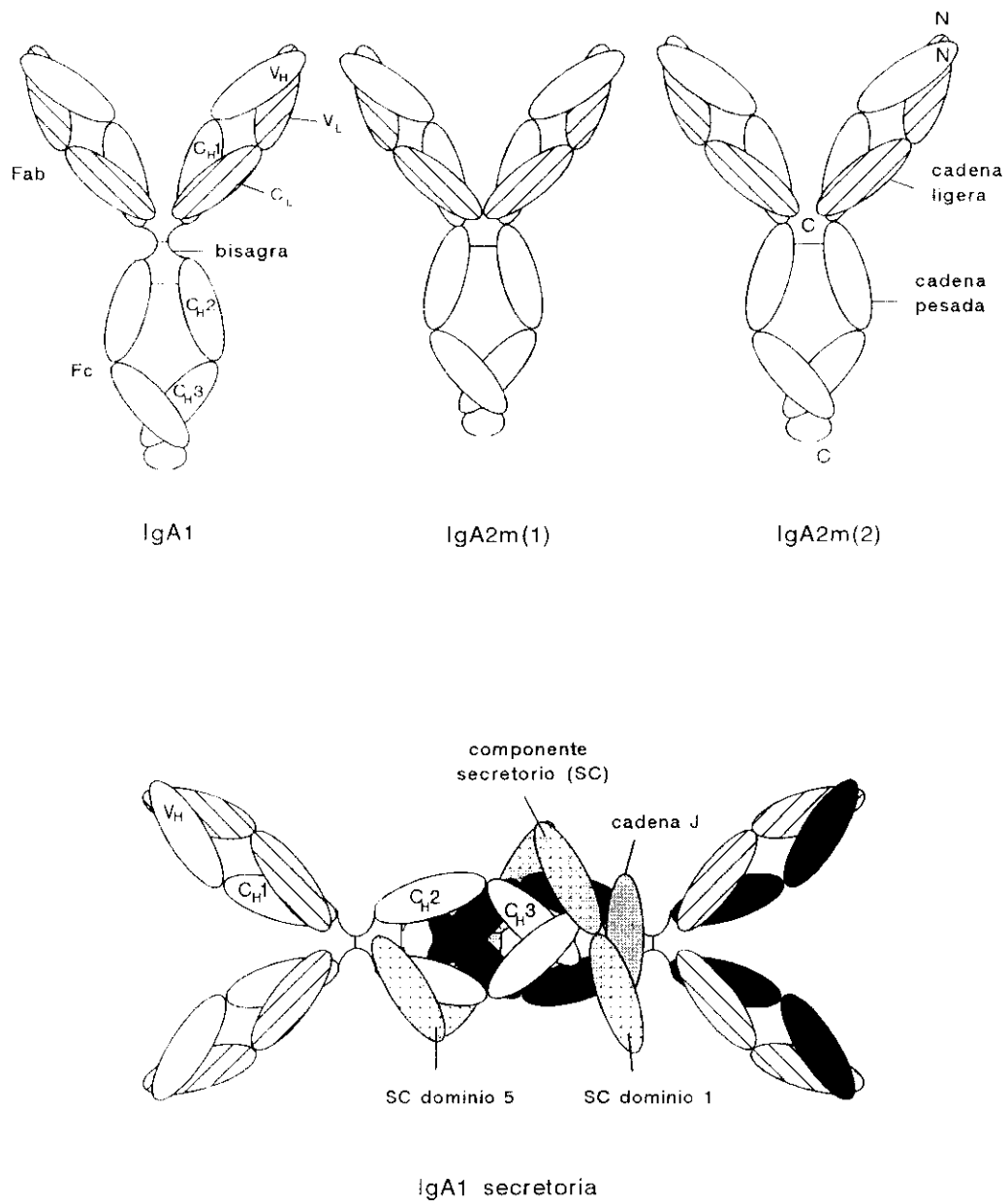
Las **variantes alotípicas de la IgA2** se diferencian en importantes aspectos. A2m(1) carece de puentes disulfuro entre cadenas pesadas y ligeras, permitiendo así que las dos cadenas ligeras se unan entre sí. Además, para mantener su integridad estructural, las interacciones no covalentes son mucho más fuertes en la A2m(1) que en la A2m(2) o la IgA1. Estas características estructurales diferentes, junto con algunos cambios puntuales en la secuencia de aminoácidos, dan como resultado un cambio conformacional en torno a la Cys-220, que determina probablemente el carácter alotípico. La región bisagra es idéntica en los dos alotipos A2m. Ambos tienen cinco oligosacáridos de galactosamina menos que la IgA1, además de la delección de 13 aminoácidos ya mencionada, por lo que en su secuencia aparecen cinco residuos de Pro seguidos, hecho que les dota de una gran rigidez.

Se ha postulado que la cadena α de A2m(1) se habría originado por un cruzamiento interdominios entre los genes que codifican $\alpha 1$ y A2m(2), resultando una cadena recombinante o híbrida, que comenzaría como $\alpha 2$ y terminaría como $\alpha 1$ [2, 8, 11].

Una pequeña cantidad de la IgA sérica se encuentra en **formas poliméricas**, normalmente dímeros, unidos a través de puentes disulfuro (entre el dominio C_H2 y el extremo C-terminal de la cadena α) y por una cadena polipeptídica adicional de aproximadamente 16 kDa, denominada cadena J [1]. En la secuencia de aminoácidos de la cadena J humana y murina aparecen ocho residuos de Cys, seis de los cuales forman puentes disulfuro intracadena. Las otras dos Cys restantes de la cadena J se unen a las penúltimas

Cys de las cadenas α de la IgA, formando así la IgA polimérica. En algunas moléculas de IgA se ha detectado un segundo puente disulfuro con una Cys en el dominio C_H2. Hasta el momento no ha sido elucidada totalmente la naturaleza exacta de la interacción entre la cadena α y la cadena J [13].

La forma predominante de la IgA en las secreciones salivares, lacrimales, bronquiales, nasales e intestinales se denomina **IgA secretoria**. La IgA monomérica aparece poco en las secreciones, siendo la forma dimérica, de coeficiente de sedimentación 11S, la predominante, aunque también pueden detectarse estados de agregación superiores, particularmente tetrameros. Esta IgA polimérica secretoria, de aproximadamente 400 kDa de peso molecular, comprende no solo la IgA dimérica y la cadena J, sino también una proteína altamente glicosilada, denominada componente secretorio (SC), que forma el complejo con la IgA durante el proceso de secreción [4, 10]. El SC es una proteína algo heterogénea, cuyo peso molecular está comprendido entre 50 y 90 kDa. La presencia de SC estabiliza la estructura de la IgA secretoria y aumenta su resistencia a la proteólisis, aunque el SC en forma libre es muy susceptible al ataque por proteasas. La interacción entre SC e IgA se produce a través de puentes disulfuro entre las Cys del dominio C_H2. Algunos estudios inmunoquímicos implican también al dominio C_H3, lo que no impide la accesibilidad de la región constante de la IgA secretoria [8, 14].

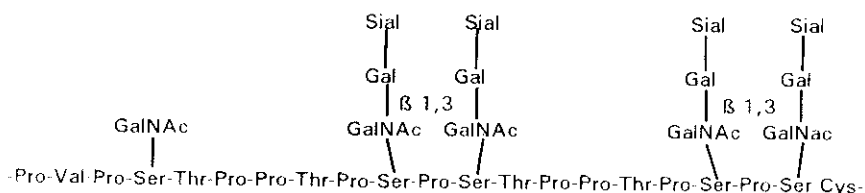


Estructura de las moléculas de IgA1, IgA2m(1), IgA2m(2) e IgA1 secretoria.

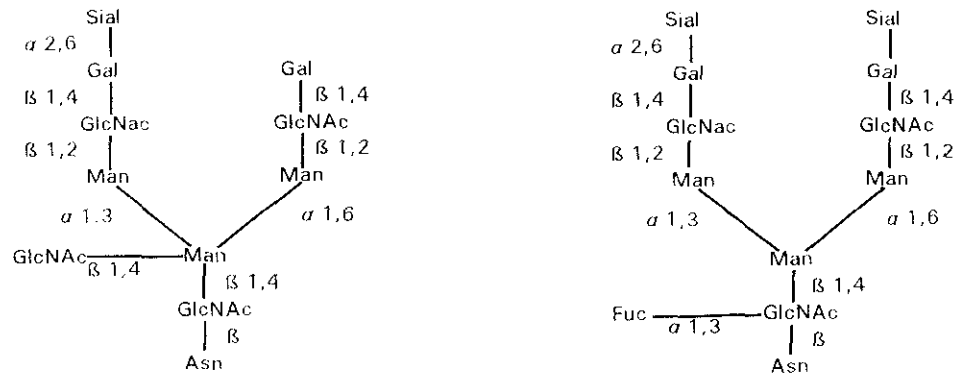
Una mención especial merece la **glicosilación** de la molécula de IgA. El contenido en carbohidratos de la IgA (7-8%) es mucho mayor que el de la IgG (2-3%), pero más bajo que el del resto de las inmunoglobulinas (12-13%) [2]. La IgA1 contiene dos posibles sitios de N-glicosilación (unidos a Asn), además de cinco sitios con uniones de tipo O en la región bisagra (unidos a Ser). La IgA2 pierde estos oligosacáridos con uniones O, pero el alotipo A2m(1) posee dos sitios extra de unión N-glicosídicas, en los dominios C_H1 y C_H2 respectivamente. A2m(2) posee además una unión de tipo N en el dominio C_H1 [15, 16].

En la IgA1 sérica los carbohidratos unidos por enlaces de tipo O son de composición sencilla, es decir, de los cinco posibles, uno de ellos contiene un solo residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc), mientras que los cuatro restantes poseen uniones de tipo β 1-3 entre galactosa (Gal) y GalNAc, algunos de ellos con ácido siálico en el extremo terminal. En la IgA secretoria suelen ser más complejos y heterogéneos, pudiendo detectarse ácido siálico, N-acetilglucosamina (GlcNAc) y fucosa [17]. Los carbohidratos de las uniones N-glicosiladas de la región constante de la IgA son aún mas complejos y variados en su estructura, encontrándose Gal, manosa, fucosa, GlcNAc y ácido siálico [15, 16].

La cadena J, con un 8% de contenido en carbohidratos, posee una cadena simple con uniones N-glicosídicas. El SC es una molécula altamente glicosilada (22% de carbohidratos), con 5-7 cadenas en su estructura. Se postula que la estabilidad que el SC confiere a la molécula de IgA secretoria es debida en gran parte a este alto contenido en carbohidratos [8].



Enlaces O-glicosídicos en la región bisagra de la IgA1



Enlaces N-glicosídicos en la región constante de la IgA1

1.3.- FUNCIONES DE LA IgA:

La función de la IgA en las secreciones es proteger el cuerpo, en las superficies de la mucosa, frente a los microorganismos invasores, virus neutralizantes, toxinas y enzimas, además de prevenir el paso de los antígenos a través de las barreras epiteliales [10, 18]. Estas funciones de la IgA secretoria han sido muy bien estudiadas. Sin embargo, las funciones de la IgA sérica, que circula en grandes concentraciones en la sangre, no se han determinado con exactitud. Los escasos conocimientos acerca de las funciones de los anticuerpos de IgA circulantes están en estos momentos siendo revisados en extensión, debido a los receptores para IgA descubiertos recientemente en diferentes tipos celulares, sobre todo en células sanguíneas.

En la siguiente tabla se resumen todas las funciones de la IgA descritas hasta el momento, indicando cuáles de ellas son dependientes (+) o independientes (-) de la región constante (Fc) de la inmunoglobulina [19].

Funciones biológicas de la IgA

IgA sérica

- Actividad anti-inflamatoria bloqueante de reacciones mediadas por IgG, IgE e IgM:
 - . quimiotaxis, fagocitosis (+)
 - . lisis mediada por anticuerpos (+)
 - . anafilaxis, reacción de Arthus (+)
- Eliminación hepatobiliar de inmunocomplejos (+)

IgA secretoria

- Inhibición de la adherencia microbiana a las superficies:
 - . aglutinación de microorganismos (+)
 - . reducción de hidrofobicidad y carga negativa (+)
 - . bloqueo de las adhesinas microbianas (?)
- Neutralización de virus (?), toxinas y enzimas (-)
- Inhibición de la penetración de antígenos a través de superficies mucosas (+)
- Opsonización de neutrófilos y macrófagos en las mucosas (+)
- Aumento de la actividad de algunos factores antibacterianos no específicos en las secreciones (+)

IgA sérica y secretoria

- Mediación de la actividad bactericida dependiente de monocitos (+)
 - Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos:
 - . unión a receptores específicos (+)
 - . activación del complemento por la vía alternativa (\pm)
-

1.4.- RECEPTORES DE IgA:

Hasta el momento se han descrito tres tipos de receptores capaces de unir IgA: receptor de inmunoglobulinas poliméricas, receptor de asialoglicoproteínas (incluido en el grupo de lectinas que unen la IgA a través de sus residuos hidrocarbonados) y receptor para la región Fc de la IgA [8, 18, 20].

1.4.1.- Receptor de inmunoglobulinas poliméricas:

La mayor parte de la IgA que se produce en los linfocitos de la mucosa está formada por dímeros asociados por la cadena J. Estos dímeros se unen rápidamente al receptor de inmunoglobulinas poliméricas, presente en la superficie de las células epiteliales que recubren las superficies mucosas [21]. Dicho receptor posee una masa molecular de 100 kDa y es el precursor del componente SC. Se trata de un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, compuesto por cinco dominios del tipo inmunoglobulina, una región transmembrana de 23 residuos y una zona citoplásmica de 103 aminoácidos [22].

Una vez sintetizado, el receptor se dirige específicamente hacia la membrana basolateral de las células epiteliales, donde es capaz de unirse a la IgA polimérica con elevada afinidad. Después de la unión se produce la transcitosis del complejo hacia la superficie luminal. En este punto se produce una ruptura del receptor por acción de una o más proteasas, liberándose la IgA asociada al SC. Un pequeño fragmento (20 kDa) del receptor se queda unido a la membrana y es posteriormente degradado en el interior de la célula [20, 23].

En los roedores, el receptor de inmunoglobulinas poliméricas está expresado en la superficie sinusoidal de los hepatocitos, y juega en el hígado un papel clave en la translocación de la IgA hacia el tracto gastrointestinal superior [4, 10]. Las formas poliméricas de la IgA se transportan de una forma muy eficaz desde la circulación hasta la bilis. Este transporte hepatobiliar mediado por SC representa un hecho fundamental en el aclaramiento de la circulación de los complejos antígeno-IgA polimérica, siempre que los complejos tengan un tamaño no superior a 19S [24]. En el hombre y otros animales parece

ser que este mecanismo no funciona, aunque se ha demostrado recientemente que los hepatocitos humanos expresan algunos receptores para inmunoglobulinas poliméricas [25].

1.4.2.- Receptores para los carbohidratos de la IgA:

La interacción de la IgA con los hepatocitos también puede tener lugar a través del receptor de asialoglicoproteínas (ASG). Esta lectina reconoce los carbohidratos unidos por enlaces O-glicosídicos presentes en las glicoproteínas desializadas y está descrito en los hepatocitos de la mayoría de los animales y del hombre [8].

El receptor ASG de conejo está formado por dos especies moleculares, de 40 y 48 kDa respectivamente. El receptor aislado de hígado de rata presenta tres moléculas distintas, denominadas R1 (41.5 kDa), R2 (49 kDa) y R3 (54 kDa). Las moléculas de R2 y R3 son idénticas en cuanto a su secuencia y sólo difieren en el grado de glicosilación y/o las modificaciones postraduccionales [26].

El receptor ASG de hepatocitos humanos, de 46 kDa, está compuesto por un núcleo central polipeptídico de 34 kDa y posee dos uniones N-glicosídicas, con una concentración elevada de manosa. Esta proteína presenta una elevada afinidad por las asialoglicoproteínas, es dependiente de calcio y sensible a neuraminidasa [27]. Existen dos tipos de receptor ASG de hepatocitos humanos, H1 y H2, homólogos a los receptores de rata R1 y R2/3, respectivamente [28].

El papel de esta lectina hepática en el hombre no está del todo determinado, aunque se sabe que puede unir IgA secretoria y del suero. Por otro lado la IgA1 sérica humana (polimérica y monomérica) es capaz de interaccionar con los hepatocitos de rata a través de este receptor ASG [29]. Este receptor presenta una gran afinidad por la región bisagra de la IgA humana, que contiene principalmente GalNAc y Gal [30].

Una vez unida al receptor ASG en hepatocitos, la IgA es endocitada, pero, al contrario de lo que ocurre con otras glicoproteínas, no toda la IgA es degradada. En roedores, la IgA polimérica del suero puede unirse al receptor de inmunoglobulinas poliméricas y al ASG. Mientras que la IgA polimérica de ratón se une vía SC, para luego ser liberada a la bilis, la IgA polimérica humana puede ser reconocida por el componente

secretorio y por el receptor ASG. Se supone que inicialmente es capturada de la circulación por el receptor ASG, y más tarde se produce un intercambio por el receptor de inmunoglobulinas poliméricas en el proceso de transporte. Este hecho implica que los dos receptores poseen, en algún momento, un compartimento intracelular común [31].

La posible existencia de receptores del tipo ASG capaces de unir IgA humana también ha sido demostrada en macrófagos peritoneales de rata [32, 33] y de calostro [34]. En estudios *in vitro*, estas células son capaces de unir, internalizar y degradar inmunocomplejos de IgA a través de los residuos hidrocarbonados de la proteína, principalmente de las Gal, sugiriendo un papel fundamental del receptor ASG en todos estos procesos, aunque la naturaleza de la unión de la IgA a este tipo de células no se ha definido con exactitud.

Recientemente se ha descrito un sistema de reconocimiento vía carbohidratos, análogo y complementario al receptor ASG hepático, presente en leucocitos [35]. Mientras el receptor hepático está implicado en el catabolismo de las asialoglicoproteínas, el receptor en leucocitos participa en la comunicación entre las células del sistema inmune y en las reacciones locales que ocurren en el proceso inflamatorio.

Existen otras lectinas con capacidad de unión de IgA a través de los carbohidratos presentes en la región bisagra de la inmunoglobulina. Es el caso de la jacalina, proteína procedente de algunas especies de *Artocarpus*, que une IgA1 humana, pero no IgG o IgM, específicamente a través de los residuos de Gal [36].

1.4.3.- Receptor para la región constante de la IgA:

Las investigaciones realizadas en los últimos años con respecto a los receptores de inmunoglobulinas han estado enfocadas principalmente al estudio de los receptores de IgG. Es por esto que los receptores para la región constante de la IgG (receptores $Fc\gamma$) de diferentes tipos de células están en la actualidad muy bien caracterizados en cuanto a su estructura, síntesis, expresión, mecanismos de actuación y funciones [37, 38]. Sin embargo, los receptores para la región constante de la IgA (receptores $Fc\alpha$) han recibido una atención relativamente escasa por parte de los investigadores. Hasta el momento, se ha demostrado

la existencia de receptores $Fc\alpha$ en granulocitos, monocito/macrófagos, linfocitos y bacterias [8, 18, 20]. En estos estudios se han utilizado diferentes técnicas, como roseteo con eritrocitos recubiertos de IgA, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación y unión de proteínas radiactivas, entre otras. A continuación expondremos con más detalle los receptores en las diferentes células.

1.4.3.a.- Receptores en células fagocíticas:

La existencia de receptores para IgA en **neutrófilos** fue demostrada por primera vez por Fanger y col., que utilizaron técnicas de roseteo con eritrocitos recubiertos de IgA para determinar la distribución celular y la especificidad de la interacción de la IgA con los polimorfonucleares. La expresión del receptor de IgA en neutrófilos de sangre periférica aumenta por la incubación con IgA [39, 40].

Otros agentes externos, como el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y el de granulocitos/monocitos (GM-CSF) inducen en los neutrófilos un aumento rápido en la afinidad de los receptores para IgA, fenómeno asociado con el desarrollo de la fagocitosis mediada por IgA [41].

El receptor de IgA aislado de la membrana de los polimorfonucleares humanos es una proteína altamente glicosilada, con un peso molecular de 50-70 kDa, específica para IgA1 e IgA2, pero incapaz de unir IgG o IgM [42]. La afinidad del receptor por la IgA es de $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, mayor que la descrita para el receptor de IgG. El sitio de unión no se ha determinado con detalle todavía, aunque existen evidencias de que reside en la región Fc de la inmunoglobulina, estando implicados posiblemente los dominios C_{H3} y C_{H2} [43, 44].

La función de los receptores de IgA en los polimorfonucleares humanos todavía no está muy bien determinada. Se han publicado datos contradictorios en cuanto a la capacidad de la IgA de estimular la fagocitosis, aunque los más recientes sugieren que la IgA puede actuar como una opsonina [45]. En estudios *in vitro*, la unión de IgA en forma agregada a los neutrofilos humanos causa degranulación, inicio de la respuesta oxidativa y producción del factor activador de las plaquetas (PAF) y de algunos derivados del ácido araquidónico, de forma análoga a los inmunocomplejos de IgG [46-48].

La unión de la IgA a sus receptores en los **eosinófilos** humanos es una señal de inicio de la degranulación [49]. El receptor $Fc\alpha$ de estas células es muy similar al descrito en los neutrófilos, con un peso molecular algo superior (70-100 kDa). Está compuesto por un núcleo proteico de unos 32 kDa y tiene un elevado contenido en carbohidratos unidos por enlaces de tipo N [50].

La existencia de receptores para IgA en los **monocitos** humanos de sangre periférica se ha demostrado mediante varias técnicas, como formación de rosetas con eritrocitos recubiertos de IgA [39, 40], inmunofluorescencia indirecta con IgA1 e IgA2 [51, 52] e inhibición competitiva de la unión de IgA marcada radiactivamente [53].

Los ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-IgA con membranas procedentes de granulocitos, monocitos y células de la línea monocítica U937 han permitido el aislamiento de receptores $Fc\alpha$ con características similares en los tres tipos de células. Se trata de una proteína de transmembrana de 60 kDa de peso molecular, con un punto isoelectrico de 4.5-5.6 y un alto contenido en carbohidratos, capaz de unir IgA1 e IgA2 (polimérica y monomérica) a través de su región Fc. Por tratamiento del receptor con N-glicanasa (enzima que rompe las uniones de tipo N de los carbohidratos) se obtienen dos proteínas de 32 y 36 kDa. La expresión del receptor $Fc\alpha$ aumenta en presencia de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y de IgA [54].

Recientemente se ha clonado el cDNA correspondiente al receptor $Fc\alpha$ en monocitos humanos, a partir de una librería de cDNA de la línea monocítica U937. Este gen codifica una proteína madura de 266 aminoácidos, con un tamaño previsto de 30 kDa, compuesta por una región extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracitoplásmico. La región extracelular está formada por dos dominios, con seis posibles sitios de unión de tipo N para carbohidratos y presenta una gran homología con los receptores de IgG e IgE. Este hecho sugiere que dichos receptores derivan del mismo ancestro común. La presencia de un residuo cargado en su región de transmembrana (Arg 230) podría indicar que este receptor está asociado a otras moléculas formando un complejo. Esta asociación puede tener importancia en los mecanismos de transducción de la señal del receptor de IgA [55].

En los **macrófagos** alveolares de ratón y rata se han detectado receptores $Fc\alpha$ mediante técnicas de roseteo y microscopía de transmisión de electrones de células marcadas con partículas de oro [56, 57]. En un sistema heterólogo, se ha determinado la presencia

de 3.3×10^5 receptores para IgA en la superficie de los macrófagos de pulmón de conejo, con una afinidad de $5.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [58]. Los macrófagos peritoneales de rata son capaces de unir, internalizar y degradar IgA1 e IgA2, tanto secretoria como sérica. Aunque la naturaleza exacta de dicha unión no está muy bien determinada, es probable que las cadenas hidrocarbonadas de la IgA participen en la unión al receptor [32, 33]. El receptor para IgA en los macrófagos peritoneales de rata está formado por dos subunidades, de 70 y 56 kDa, que se pueden encontrar en forma soluble o asociadas a la membrana celular [59].

Los inmunocomplejos de IgA estimulan el metabolismo de los monocito/macrófagos, induciendo fagocitosis de células diana [40, 60, 61], liberación de ion superóxido y H_2O_2 [53, 60], producción de prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LT) [62], y síntesis de interleucina 1 (IL-1) [63] y factor de necrosis tumoral ($\text{TNF}\alpha$) [64]. Los receptores $\text{Fc}\alpha$ juegan también un papel importante en el catabolismo de los inmunocomplejos de la IgA y en el aclaramiento de los inmunocomplejos de la circulación [33].

La existencia de receptores para IgA se ha investigado también en otros tipos de células fagocíticas no sanguíneas. En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que los **hepatocitos** y las **células de Kupffer** son capaces de unir IgA polimérica y monomérica a través de un receptor específico para la región Fc de la inmunoglobulina, que es distinto del receptor SC y del receptor de inmunoglobulinas poliméricas descritos anteriormente [65, 66]. En estudios *in vivo* las células de Kupffer participan en el aclaramiento de los inmunocomplejos de IgA de la circulación [67].

1.4.3.b.- Receptores en linfocitos:

La presencia de receptores para IgA se ha detectado en subpoblaciones de células T y B de varias especies, tanto en la circulación como en los tejidos linfoides, especialmente en el tejido linfoide asociado al intestino. El porcentaje de linfocitos T o B que expresan estos receptores suele ser bajo, pero puede ser aumentado en presencia de IgA y otros agentes mitogénicos [68, 69].

El receptor de las células B humanas específico para IgA es distinto del receptor para IgG y presenta una afinidad del orden de 10^6 M^{-1} [70]. La presencia de IgA inhibe su propia

síntesis e impide la diferenciación y/o proliferación de las células B [68]. El receptor de células B murinas puede unir IgA en medio ácido y es sensible al tratamiento con tripsina e insensible a la neuraminidasa. Su expresión en la membrana de las células aumenta en presencia de IgA polimérica y disminuye cuando se produce la activación de la proteína quinasa C (PKC) [71].

La unión de IgA a los receptores de linfocitos T murinos no se ve afectada por la presencia de otras clases de inmunoglobulinas, ni por proteínas desializadas o Gal [69]. Se ha descrito un receptor soluble en éstas células T con un peso molecular de 56 kDa [72].

Los receptores para IgA de los linfocitos T citotóxicos participan en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, mientras que los receptores de los linfocitos B y de los T no citotóxicos están implicados en la regulación de la síntesis de IgA [8].

1.4.3.c.- Receptores en bacterias:

Existen ciertas moléculas en la pared celular de algunas bacterias que pueden unirse a la IgA. El estudio de las interacciones entre estos receptores y la IgA es de gran importancia si se quieren conocer a fondo los mecanismos moleculares por los cuales las bacterias producen infecciones en las membranas de las mucosas, lugar donde la IgA es la inmunoglobulina predominante.

Los estreptococos del grupo A poseen receptores de alta afinidad para la IgA humana, con un peso molecular aproximado de 41 kDa y actividad anti-fagocítica [73, 74].

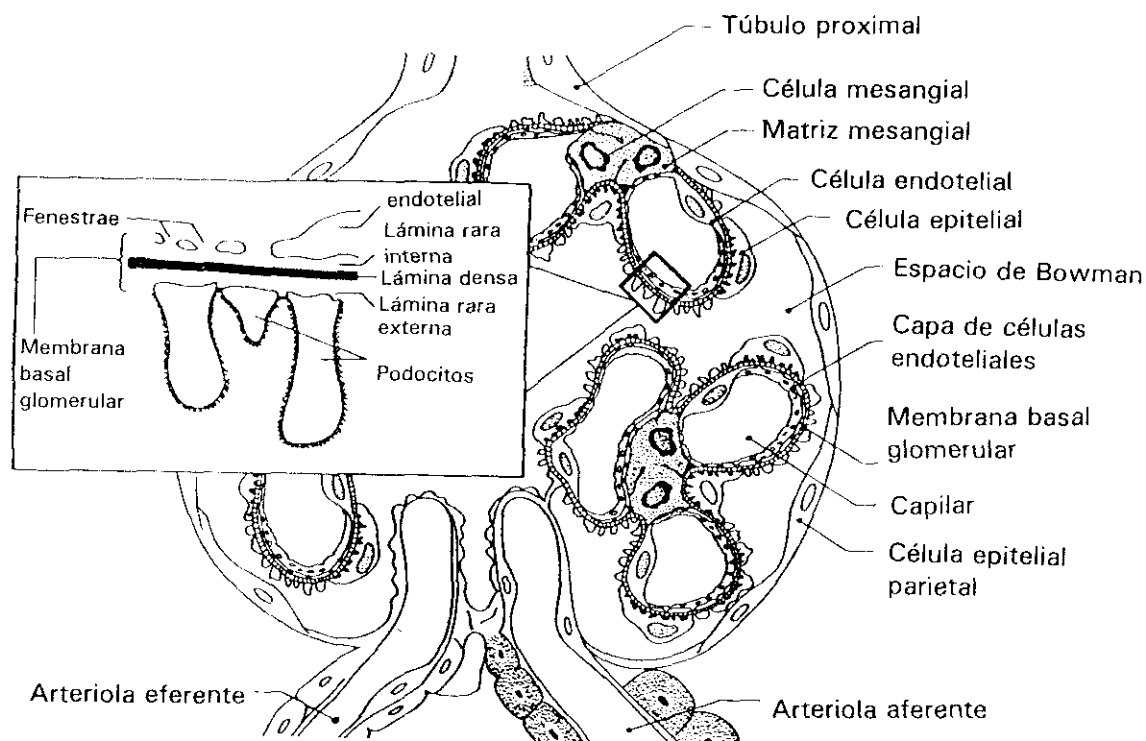
El receptor de IgA de los estreptococos del grupo B es una proteína de 130 kDa que, al igual que su homólogo en el grupo A, reconoce la región Fc de la IgA (polimérica y monomérica), pero no de la IgG o la IgM [75].

Algunas proteínas procedentes de estafilococos son capaces de unir IgA, aunque probablemente la unión no tiene lugar a través de la región Fc de la inmunoglobulina, sino del dominio C_{H1}. El significado de esta interacción *in vivo* permanece sin resolverse [8].

2.- MESANGIO Y ENFERMEDAD GLOMERULAR

2.1.- ESTRUCTURA DEL MESANGIO

El glomérulo renal está formado por una red de capilares procedentes de la arteriola aferente que se dividen en 4-8 lóbulos dentro del ovillo glomerular y luego se vuelven a juntar para formar la arteriola eferente. Dentro del glomérulo existen cuatro tipos distintos de células (células endoteliales, mesangiales, epiteliales y macrófagos residentes), una pared capilar (la membrana basal) y una región intersticial o de soporte (mesangio). El ovillo glomerular está rodeado por la cápsula de Bowman, una extensión de la membrana basal del túbulo proximal que contiene una fina capa de células escamosas (células parietales epiteliales) [76, 77, 78].



Estructura del glomérulo

El mesangio ocupa la parte central del glomérulo y está formado por células mononucleares estrelladas, las células mesangiales, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular amorfa [77].

La caracterización de las células mesangiales *in vivo* ha demostrado que no constituyen una población homogénea, pues se ha detectado la existencia de dos subpoblaciones diferentes. La mayoría exhiben características parecidas a las células del músculo liso vascular, pues son contráctiles y contienen filamentos [79]. Sin embargo, estas células mesangiales intrínsecas también presentan otras características típicas de los macrófagos, tales como la capacidad de unir inmunocomplejos a través de receptores Fc, expresar antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), funcionar como células presentadoras de antígenos y liberar radicales libres de oxígeno y proteasas [77, 80-82]. El segundo tipo de célula mesangial, denominada extrínseca, representa un 5% de las células en el mesangio y lo constituyen las células derivadas de la médula ósea, con tinción Ia^+ y características típicas de los monocito-macrófagos [83].

Por microscopía electrónica las células mesangiales presentan una baja proporción citoplasma/núcleo, con proyecciones citoplasmáticas que contienen fibras de 70-100 Å de diámetro. El cuerpo celular contiene mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y una densa red de microtúbulos y filamentos intermedios compuestos principalmente por miosina y actomiosina. Las bandas de actina se extienden a lo largo de las proyecciones de la célula mesangial, estableciendo contacto con la membrana basal glomerular, concretamente con su lámina rara interna y su lámina densa [77, 78]. Se ha estimado que las células mesangiales representan aproximadamente un tercio del total de las células glomerulares en la rata, considerando que por glomérulo hay unas 600-750 células [84].

En las zonas del glomérulo donde no hay contacto directo, las conexiones entre células mesangiales y membrana basal glomerular se establecen a través de la matriz extracelular. Se trata de una malla de microfibrillas ancladas a la membrana de la célula a través de fibronectina, su principal componente. La matriz mesangial posee una estructura menos organizada y más flexible que la membrana basal glomerular y está formada por colágenos, glicoproteínas de adhesión y glicosaminoglicanos [85].

El colágeno de tipo IV es el más abundante en la matriz mesangial y aparece formando redes abiertas, proporcionando gran elasticidad, poca resistencia a la tensión y

facilidad para el paso de los fluidos [86].

Del total de los proteoglicanos glomerulares, aproximadamente el 90 % se encuentra en la matriz mesangial. Están compuestos principalmente por dermatán y heparán sulfato y, además de conferir estabilidad a la matriz mesangial, participan en el transporte mesangial selectivo de las macromoléculas, funcionando como un tamiz molecular o intercambiador catiónico [87].

Existen tres tipos de proteínas de adhesión en la matriz mesangial: fibronectina (componente mayoritario), laminina y trombospondina. Además, en el mesangio se encuentran, de forma exclusiva, la actomiosina y el componente P del amiloide, cuyo significado biológico no se conoce aún. Las glicoproteínas participan en la adhesión de las células mesangiales entre sí o a la matriz, estabilizando la organización supramolecular de la matriz mesangial, promueven la endocitosis y fagocitosis de macromoléculas y participan en la proliferación de las células mesangiales [77, 88].

2.2.- FUNCIONES DE LA CELULA MESANGIAL

Las células mesangiales no sólo ocupan una posición central en la estructura glomerular, sino que mantienen un papel clave y muy importante en los aspectos funcionales del glomérulo [89]. Las funciones de la célula mesangial se resumen en la siguiente tabla y a continuación se destacan las más importantes.

Funciones de la célula mesangial en el glomérulo

-
- Proporciona el soporte estructural necesario para los lazos capilares
 - Modula la filtración glomerular, por su característica de músculo liso
 - Genera agentes vasoactivos: renina, PG, PAF
 - Sintetiza y degrada elementos estructurales: proteínas de matriz
 - Participa en el procesamiento de macromoléculas: inmunocomplejos
 - Sus productos son claves en la regulación de la proliferación celular
 - Modula el daño glomerular
-

2.2.1.- Control de la filtración glomerular:

La estratégica localización de la célula mesangial, junto con las propiedades de contracción y relajación que posee, hacen de esta célula la candidata ideal para el control de la filtración glomerular [78]. Se han descrito un gran número de agentes que actúan sobre las células mesangiales provocando su contracción [89], entre los que se incluyen:

- hormonas y factores de crecimiento: angiotensina II (AII), endotelina (ET), vasopresina, norepinefrina y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).
- inmunocomplejos
- lípidos bioactivos: tromboxano A_2 (TxA_2), $PGF_{2\alpha}$, PAF, LTC_4 y LTD_4 .
- citocinas: IL-1, IL-6

La unión de estos agonistas a su receptor en la célula mesangial produce la activación de la fosfolipasa C (PLC) vía proteínas G, que conduce a la fosforilación de la PKC y a la liberación de calcio intracelular, causando la contracción de la célula [90].

Otras hormonas pueden activar la cascada de los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) pudiendo ejercer de esta forma un efecto antagonista de los factores de la contracción o un efecto directo de relajación. Algunos factores estimulan la producción mesangial de PGE_2 (vía liberación de ácido araquidónico y/o activación de la fosfolipasa A_2), lo que supondría un sistema de retroalimentación negativa de la contracción [89].

2.2.2.- Capacidad fagocítica:

Las propiedades fagocíticas de las células mesangiales están muy bien documentadas desde el punto de vista morfológico. Ciertas macromoléculas como ferritina, carbón coloidal, globina, proteínas agregadas e inmunocomplejos son fagocitadas por las células mesangiales [78]. En un principio se pensaba que sólo las células Ia^+ del mesangio, es decir, los monocito/macrófagos derivados de la médula ósea, eran los responsables de la fagocitosis. Sin embargo, existen evidencias de que las propias células mesangiales

participan en los procesos de fagocitosis del zimósán opsonizado o de partículas de oro coloidal recubiertas de suero [81, 91].

Recientemente se ha demostrado la capacidad de las células mesangiales de rata en cultivo de fagocitar inmunocomplejos de IgG. La endocitosis se produce a través de un mecanismo de reconocimiento específico que depende de la región constante de la inmunoglobulina. El receptor $Fc\gamma$ de las células mesangiales es una proteína de 45-55 kDa de peso molecular, con características muy similares al receptor $Fc\gamma RII$ de los macrófagos y alta afinidad por la IgG [92-94].

La presencia de factor estimulador de colonias 1 (CSF-1), AMPc, AII e interferón- γ (INF- γ) causa un aumento de la fagocitosis de los inmunocomplejos a través del receptor $Fc\gamma$ [95, 96], mientras que morfina, péptido natriurético atrial (ANP) y dopamina disminuyen la fagocitosis [96, 97]. La unión y posterior endocitosis de los inmunocomplejos activa rápidamente a las células mesangiales, que sintetizan y liberan al medio extracelular PGE₂, PAF, productos de la lipooxigenasa, ión superóxido y algunas citocinas (IL-1, IL-6, proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1)) [93, 94, 98-100]. También se produce movilización de calcio intracelular y activación de la PLC, con la subsiguiente liberación de inositoltrifosfato (IP₃) [101].

2.2.3.- Proliferación mesangial:

Existe un gran número de mediadores que están implicados en la proliferación de las células mesangiales. Estos factores de crecimiento pueden ser secretados no sólo por las células inflamatorias y las células endoteliales vecinas, sino por las propias células mesangiales, actuando así de forma paracrina o autocrina. No todos ellos actúan de forma directa sobre las células mesangiales, pues algunos de ellos estimulan la síntesis de otros mitógenos, amplificándose la respuesta proliferativa [79, 89, 90, 102].

Los experimentos de proliferación se han realizado en células mesangiales de diferentes especies, en cultivos primarios, subcultivadas o transformadas por virus, tanto de riñones adultos como fetales. Por esta razón, no es nada sorprendente que aparezcan en la literatura referencias contradictorias en cuanto a la actividad mitogénica *in vitro* de algunos

factores, como IL-1, IL-6, $\text{TNF}\alpha$ y AII, entre otros [103]. Esta aparente contradicción podría resolverse con la ayuda de los estudios *in vivo*.

Factores que regulan la proliferación de las células mesangiales en cultivo

Mitogénicos	Anti-mitogénicos	Controvertidos	Sin efecto
PDGF	ANF	AII	endotoxina
EGF	AMPc	IL-1 (α y β)	G-CSF
bFGF	glucosa (alta conc.)	IL-6	GM-CSF
TGF- α	heparan sulfato	$\text{TNF}\alpha$	M-CSF
TGF- β (baja conc.)	IFN- γ		gastrina
IGF-1	PGI ₂ , PGE ₂ , TxA ₂		glucagón
insulina	TGF- β (alta conc.)		IL-3
ET	LDL (alta conc.)		IL-4
fibronectina			secretina
serotonina			somatostanina
arginina-vasopresina			
bradikinina			
PGF _{2α}			
trombina			
PAF			
LDL (baja conc.)			

Las vías de transducción de la señal de estos factores mitogénicos no están muy bien estudiadas, aunque probablemente incluyen fosforilación de tirosina quinasas, treonina/serina quinasas y quinasa activable por mitógenos, entre otras [90].

La respuesta proliferativa es un hecho normal en la célula mesangial. Además, la proliferación sirve para repoblar el mesangio después de haber sufrido algún daño celular, por ejemplo, el inducido por la isquemia. Sin embargo, el desequilibrio en el control de la proliferación de las células mesangiales glomerulares constituye una causa inicial y muy importante en la génesis del daño glomerular progresivo [103, 104].

2.2.4.- Producción de mediadores de la inflamación:

La actividad biosintética de las células mesangiales se ha determinado principalmente a partir de estudios *in vitro*. Así, las células mesangiales en cultivo sintetizan un gran número de compuestos bioactivos, como enzimas, hormonas y citocinas, autacoides, componentes de la matriz e integrinas. La mayoría de estos factores afectan al crecimiento celular, la contracción y/o la síntesis de matriz por las células mesangiales [77, 105].

Factores producidos y/o expresados por las células mesangiales

Hormonas y citocinas	Componentes de la matriz	Enzimas	Autacoides
eritropoyetina	fibronectina	colagenasa	eicosanoides
ET	laminina	gelatinasa	PAF
IL-1, 6, 8	colágenos I, III, IV y V	renina	óxido nítrico
TNF α		proteínasa neutra	metabolitos
PDGF	trombospondina	5'nucleotidasa	del oxígeno
bFGF	nidogen/entactina	activadores e	
TGF- β	osteonectina	inhibidores del	
GM-CSF	condroitín sulfato	plasminógeno	
MCP-1	heparán sulfato		
CSF-1			
IGF-1			

Las células mesangiales poseen receptores para la gran mayoría de los factores señalados en la tabla anterior. La unión de cada ligando a su receptor específico de membrana provoca la activación de segundos mensajeros intracelulares que inducen respuestas celulares y señales a corto plazo. Estas pueden conectarse con los factores de transcripción y participar en los procesos a largo plazo, que implican alteraciones de la expresión génica y de la síntesis de proteínas, provocando en último término cambios específicos en el fenotipo celular [77, 104].

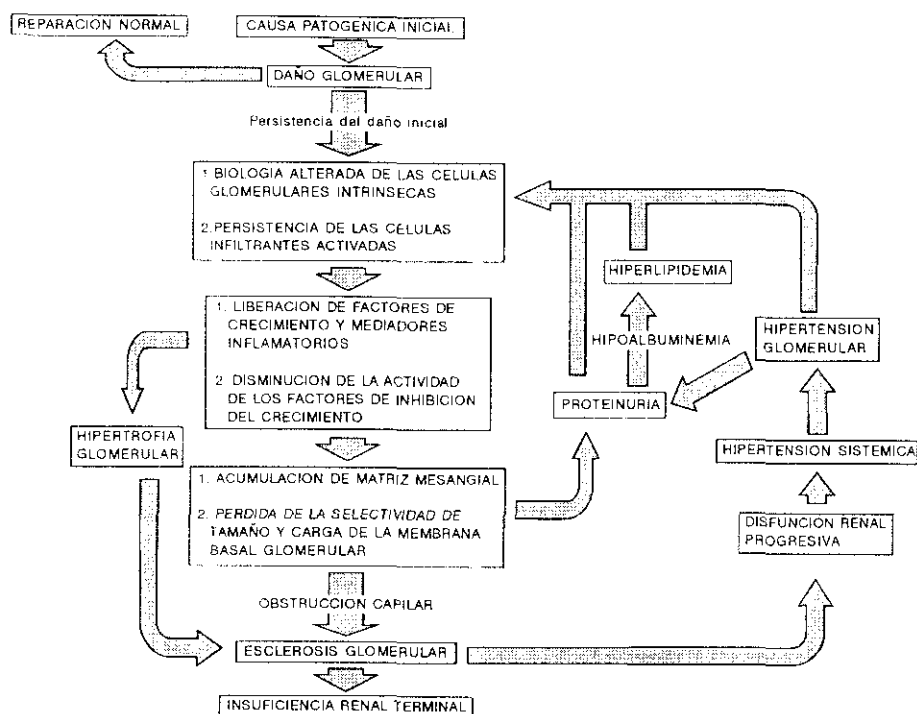
Los sistemas de transducción de la señal estudiados en las células mesangiales incluyen: proteínas G, acopladas a moléculas inhibidoras o estimuladoras citosólicas; fosfolipasas C, D y A₂; varias isoformas de la PKC; proteína quinasa A; activación de los canales de iones, transportadores e intercambiadores; estimulación de la ATPasa sodio-potasio y liberación de calcio intracelular [106].

2.3.- MECANISMOS DE PRODUCCION DE LA LESION GLOMERULAR

El daño glomerular progresivo, principal causa de la insuficiencia renal, puede ocurrir como consecuencia del depósito de componentes biológicamente activos, como inmunoglobulinas, componentes del complemento, crioglobulinas, proteínas amiloides, lipoproteínas, toxinas y algunos componentes de la pared celular bacteriana. Entre otros factores responsables de iniciar y mantener el daño glomerular cabe citar la coagulación intra y extracapilar, la acumulación de matriz mesangial (debida a un aumento de la producción o a un descenso de la degradación) y varios factores inflamatorios y promotores del crecimiento liberados por las células residentes o por las infiltrantes (células T, neutrófilos, monocito/macrófagos y plaquetas). Otras causas pueden ser de naturaleza mecánica, como la hiperperfusión o la hipertensión intracapilar, o debidas a causas metabólicas resultantes de enfermedades sistémicas, como diabetes o hiperlipidemia [76].

Gracias al desarrollo de los cultivos celulares se ha podido avanzar con rapidez en el conocimiento de la progresión del daño renal glomerular. La mayoría de los datos se han obtenido con células mesangiales, pero los mecanismos de comunicación entre los tres tipos celulares glomerulares y la biología de las células endoteliales y epiteliales no están muy bien estudiados hasta el momento, quizás debido a la dificultad que entraña el cultivo de las mismas [77].

En el siguiente esquema se resumen los mecanismos que conducen a la lesión glomerular.



2.3.1.- Patología del mesangio:

Ante cualquier agresión las células mesangiales responden inicialmente de una forma similar, esto es, proliferando y produciendo proteínas de matriz extracelular. Si la agresión es poco intensa o breve, existe una recuperación de la estructura y funciones del área mesangial. En caso contrario, puede conducir a la pérdida de la función y, en último término, a la esclerosis [107]. Por esta razón, el progreso de los mecanismos de curación-reparación y de prevención de las lesiones glomerulares exigen un mejor conocimiento de la biología celular y la fisiopatología del mesangio.

En algunos estados de la enfermedad renal los cambios mesangiales son primarios, es decir, el mesangio es el primer sitio de daño, seguido por el depósito de inmunocomplejos y la activación de mediadores de la inflamación. En otros es de tipo secundario, en los que el daño primario se produce sobre otras partes del glomérulo, pero existen cambios mesangiales mediados por factores físicos o interacciones con la matriz que pueden amplificar y acelerar el daño glomerular [108, 109].

El mesangio está constantemente perfundido por macromoléculas y residuos de la filtración glomerular, que pueden acumularse en la matriz, eliminarse por la región del lácis o endocitarse por las células mesangiales [107]. Este proceso es de particular importancia si en los residuos de la filtración se encuentran inmunocomplejos flogogénicos u otras proteínas que pueden actuar sobre las células mesangiales como estímulos mitogénicos y/o fibrogénicos. Por ello, los procesos de entrada, captación y eliminación de macromoléculas por el mesangio tienen gran importancia, no solo en la regulación y el mantenimiento de la función de filtro del glomérulo, sino también en la modulación del daño glomerular [110].

El **depósito mesangial** de las macromoléculas depende de sus características, de los mecanismos de microcirculación glomerular, de las interacciones con la matriz y de las posibles vías de salida. Otros factores atañen directamente al procesamiento por las células mesangiales, como su capacidad endocítica intrínseca, la liberación de enzimas proteolíticos, su activación a través de receptores de membrana específicos y la presencia o ausencia de factores quimiotácticos [108, 111].

Las alteraciones en la **matriz** por acumulación de estas macromoléculas o por cambios en la filtración de los capilares glomerulares pueden estimular a las células mesangiales, que producirán más matriz, contribuyendo de esta forma a la progresión de la glomeruloesclerosis [108].

Una de las características más comunes de las enfermedades glomerulares es el **aumento del número de células** en el mesangio, que puede ser debido a la infiltración de los monocito/macrófagos circulantes o a la proliferación de la población de células mesangiales intrínsecas [90]. Los factores de crecimiento implicados en este proceso pueden ser producto de ambos tipos celulares, actuando así de forma paracrina o autocrina. Un desajuste en los mecanismos de control de la proliferación de las células glomerulares supone un factor desencadenante del daño glomerular progresivo [103, 104].

En los últimos años, gracias al desarrollo de algunos modelos animales de glomerulonefritis, se ha avanzado mucho en el conocimiento de los factores que inducen activación mesangial *in vivo*. Las actividades de PDGF, IL-1 y TGF- β son las mejor descritas hasta el momento, pero es muy probable que en el desarrollo del daño glomerular estén implicados muchos más factores de crecimiento y citocinas [103, 105, 112].

Algunas estrategias terapéuticas se están desarrollando en este sentido, por ejemplo, utilizando inhibidores específicos de estos factores (de sus receptores o de sus funciones), sustituyendo las citocinas u otros mediadores por actividades biológicas antiinflamatorias, o actuando (positiva o negativamente) sobre las señales de transducción de la señal y los fenómenos de transcripción genética que se activan por interacción de las citocinas con sus receptores en la célula mesangial [112].

3.- PARTICIPACION DE ALGUNOS MEDIADORES EN EL DAÑO GLOMERULAR:

Numerosos estudios han demostrado la participación de muchas sustancias solubles en el desarrollo del daño glomerular. Mediante experimentos *in vivo* e *in vitro* se han estudiado los mecanismos de actuación por los que estos factores bioactivos conducen a la activación mesangial. En concreto, las citocinas y los factores de crecimiento han sido objeto de una gran atención [103, 112]. Las citocinas forman parte de una complicada red de comunicación entre células del sistema inmunitario y de éste con otros sistemas del organismo [113, 114]. En este apartado haremos referencia a dos de los miembros de esta gran familia, el $\text{TNF}\alpha$ y la IL-6, sobre los que trataremos en este trabajo.

3.1.- FACTOR DE NECROSIS TUMORAL:

3.1.1.- Aspectos generales:

El factor de necrosis tumoral (TNF) incluye dos proteínas muy relacionadas estructural y funcionalmente: $\text{TNF}\alpha$ o caquectina, sintetizada fundamentalmente por los monocito/macrófagos y $\text{TNF}\beta$ o linfotoxina, producto de las células linfoides [115].

El $\text{TNF}\alpha$ es un polipéptido de 45 kDa, constituido por monómeros de 16-18 kDa que se unen por interacciones no covalentes formando dímeros o trímeros [116]. La secuencia

de aminoácidos del TNF α humano maduro contiene 157 residuos y presenta un 80% de homología con el de ratón y conejo [117]. Se conoce también una forma de TNF α asociada a la membrana, de 26 kDa, aunque su significado biológico todavía no se ha determinado [118]. El TNF β es una proteína de 171 aminoácidos cuya secuencia presenta un 30% de homología con el TNF α . Ambas proteínas se unen a los mismos receptores celulares y presentan muchas actividades biológicas comunes. Sus genes residen junto a los genes de las moléculas del MHC (cromosoma 6 humano y 17 murino) [113].

El inductor más potente del TNF α *in vitro* es el lipopolisacárido bacteriano (LPS), aunque otros compuestos también activan la secreción de la citocina, como el ionóforo del calcio, ésteres de forbol, IFN- γ , CSF-1, GM-CSF, IL-1, IL-2, inmunoglobulinas, componente C5a del complemento y algunos productos derivados de parásitos, virus y otros microorganismos [119-121]. Los glucocorticoides y las prostaglandinas actúan como moduladores negativos de la síntesis de TNF α [120, 122].

La presencia del mRNA del TNF α en las células no implica necesariamente la síntesis de la proteína, ya que la biosíntesis de esta citocina está altamente regulada a nivel postranscripcional [113]. La principal forma del mRNA del TNF α es un transcripto que migra en una posición cercana al RNA ribosomal 18S. En los macrófagos murinos se ha detectado una segunda banda menos intensa cercana al 28S, que puede ser un precursor del mRNA principal del TNF α [117, 122].

Se han descrito dos receptores de membrana distintos para el TNF α , de 70 y 55 kDa. Existen también varios receptores solubles, de 28 y 30-40 kDa, procedentes de los receptores celulares, que circulan por el plasma y son capaces de neutralizar la actividad del TNF α [123]. La interacción del TNF α con su receptor celular activa múltiples vías de transducción de la señal, entre las que se incluyen las proteínas G, el AMPc y la fosfolipasa A₂. Como consecuencia de esta activación se produce la expresión de diversos genes, como los de algunos factores de transcripción, citocinas, factores de crecimiento, receptores, moléculas de adhesión celular, mediadores de la inflamación, proteínas de fase aguda y proteínas del MHC [124].

El TNF α es considerado hoy en día como un mediador central de muchos procesos inmunológicos, hematopoyéticos, inflamatorios y fisiopatológicos, al ser capaz de provocar múltiples reacciones. *In vitro* el TNF α es citotóxico para células tumorales y mitogénico

para fibroblastos, posee un efecto quimiotáctico para monocito/macrófagos y leucocitos, aumenta la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, estimula la fagocitosis y la liberación de mediadores en los leucocitos y posee actividades anti-víricas. *In vivo* el $\text{TNF}\alpha$ está implicado en la patogenia del shock endotóxico y la caquexia, en infecciones parasitarias y bacterianas y en ciertas glomerulonefritis y enfermedades de carácter autoinmune [113, 114, 124].

3.1.2.- $\text{TNF}\alpha$ en el mesangio:

El $\text{TNF}\alpha$ en el riñón puede funcionar como un factor autocrino, pues es producido por las células mesangiales, o como un factor paracrino, producto de los monocito/macrófagos que infiltran el glomérulo cuando se produce daño renal [125, 126].

Las células mesangiales de rata en cultivo son capaces de producir $\text{TNF}\alpha$ biológicamente activo cuando se estimulan con LPS, actuando de moduladores la PGE_2 y el AMPc. Al igual que ocurre en los macrófagos murinos, el $\text{TNF}\alpha$ producido por las células mesangiales de rata tiene un peso molecular de 110 kDa y posee dos mensajeros de tamaño diferente [127]. Algunas lectinas, como la gliadina, estimulan la síntesis y expresión del $\text{TNF}\alpha$ en células mesangiales [128]. También se ha detectado la presencia de $\text{TNF}\alpha$ asociado a la membrana de la célula mesangial, cuya liberación al medio extracelular puede ser controlada por desferroxamina (quelante de los radicales oxidrilo) [129].

Varios estudios han caracterizado las numerosas actividades biológicas que esta citocina ejerce sobre las células mesangiales [125, 126], que aparecen resumidas en la siguiente tabla. Entre estos efectos se incluyen la contracción [130], citotoxicidad y proliferación celular [102, 131] y la síntesis de otras citocinas [99, 132-134] y mediadores lipídicos [135].

En ocasiones el $\text{TNF}\alpha$ favorece el influjo de células inflamatorias a los sitios de daño glomerular, por inducción de la síntesis de proteínas de adhesión en el endotelio y los neutrófilos o por estimulación de la producción de factores quimotácticos por las células mesangiales [126]. También puede actuar como una potente citocina fibrogénica en el riñón, induciendo de forma indirecta el aumento de colágeno [136].

Efectos del $TNF\alpha$ sobre las células mesangiales glomerulares

- Contracción celular y reordenamiento del citoesqueleto
 - Citotoxicidad
 - Proliferación e inhibición del crecimiento
 - Efectos metabólicos: 5' nucleotidasa
fosfolipasa A_2 y prostaglandinas
AMPc, GMPc, NO
proteína quinasa
 - Receptores de la superficie celular: ICAM-1
MHC-I
MHC-II (con IFN- γ)
 - Citocinas y factores del crecimiento: IL-1, 6 y 8
IP-10
PDGF
MCP-1
GM-CSF, M-CSF
NGF (con IL-1 β)
 - Radicales libres del oxígeno
 - Mediadores lipídicos: PGE₂
PAF
 - Coagulación: factor procoagulante de tejidos
inhibidor del activador del plasminógeno
-

Numerosos estudios han demostrado la participación del $TNF\alpha$ en las glomerulonefritis humanas (proliferativas y no proliferativas). Se ha detectado la presencia del mRNA del $TNF\alpha$ en las biopsias de pacientes con glomerulonefritis rápidamente progresivas, así como niveles elevados de esta citocina en suero y orina [137]. Los monocitos de los pacientes con algunas enfermedades renales sintetizan y expresan mayores cantidades de $TNF\alpha$ que las células de los individuos control [138].

En nuestro grupo se ha trabajado con la glomerulonefritis proliferativa inducida por inyecciones repetidas de ovoalbúmina (similar a la enfermedad crónica del suero), cuya fase más aguda se caracteriza por depósitos de inmunocomplejos, proliferación mesangial e intensa proteinuria. Los glomérulos de las ratas enfermas producen mayores cantidades de $TNF\alpha$ que los controles y la expresión de mRNA también es superior [136, 139].

3.2.- INTERLEUCINA 6:

3.2.1.- Aspectos generales:

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina multifuncional producto de una gran variedad de células y juega un papel central en los mecanismos de defensa del huésped [140]. En un principio la IL-6 fue identificada como una proteína de 26 kDa producida por los monocitos periféricos activados con antígenos o mitógenos, con capacidad de inducir la producción de inmunoglobulinas en las células B [141]. Posteriormente se han caracterizado más fenómenos biológicos en los que la IL-6 está implicada, sobre todo relacionados con el crecimiento y la maduración celular [140].

La molécula de IL-6 humana está formada por 184 aminoácidos y presenta dos puentes disulfuro, que aparentemente no están implicados en la actividad biológica. El gen de la IL-6 contiene cinco exones, y la principal forma de su mensajero es un transcripto de 1.2-1.3 kb [142]. En algunas células de rata aparece un segundo transcripto, menos abundante, de 2.4 kb. La homología entre la IL-6 humana y la de rata no es muy elevada, pero se han detectado reacciones de estimulación en sistemas heterólogos [143].

El receptor de la IL-6 es una glicoproteína de 89 kDa formada por 449 aminoácidos y algunos de sus dominios presentan gran homología con la superfamilia de la inmunoglobulinas. Al contrario de otros receptores, el dominio citoplasmático del receptor de la IL-6 no es esencial en la transducción de la señal, está asociado a una proteína de 130 kDa encargada de iniciar estas señales [140].

La IL-6 puede ser sintetizada por una gran variedad de tipos celulares, como monocitos/macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células mesangiales, astrocitos y células de origen epitelial y endotelial [144]. La síntesis de IL-6 está regulada por IL-1, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF, PDGF, LPS y algunos virus [145, 146]. La producción anormal de esta citocina está muy implicada en la patogenia de las enfermedades autoinmunes y en algunas glomerulonefritis [140, 141].

Aunque la mayoría de los estudios sugieren que la IL-6 actúa como una molécula proinflamatoria, al igual que IL-1 y $\text{TNF}\alpha$, algunas de sus funciones son contrarias. Algunos investigadores han demostrado que la IL-6 no activa las células endoteliales e

inhibe la proliferación de los macrófagos peritoneales *in vitro* [147]. En ensayos *in vivo* puede suprimir los efectos locales y sistémicos del LPS, además de disminuir la producción de IL-1 y $\text{TNF}\alpha$ inducida por LPS [148].

3.2.2.- IL-6 en el mesangio:

Varios estudios han demostrado que la IL-6 es un factor autocrino para las células mesangiales. Estas células en cultivo son capaces de producir IL-6 como respuesta a la estimulación con diversos factores, como citocinas, suero de ternera fetal (STF), LPS, inmunocomplejos de IgG y algunas lectinas [94, 128, 132, 133, 149, 150]. Algunas de estas sustancias pueden regular la producción glomerular de la IL-6 de forma autocrina (IL-1 y PDGF) o paracrina (LPS, $\text{TNF}\alpha$). La inhibición de la síntesis de IL-6 en las células mesangiales no se ha estudiado con detalle, aunque se sabe que algunos componentes de la matriz, como el colágeno de tipo I pueden inhibir la producción basal o la inducida por LPS [144, 151].

La IL-6 producida por las células mesangiales de rata presenta un peso molecular variable entre 17 y 42 kDa, lo que indica que algunas formas moleculares de esta citocina están constituidas por dímeros [94, 150]. El mensajero para la IL-6 está constituido por dos mRNA, de tamaños 1.2 y 2.4 kb [94, 150, 152].

El efecto más importante de la IL-6 sobre las células mesangiales es la regulación de su proliferación. A pesar de que varios investigadores han abordado esta cuestión, existen discrepancias en cuanto al papel estimulador o inhibidor de la IL-6 de la mitogénesis mesangial *in vitro*, quizás debido a las diferentes condiciones de cultivo empleadas en los estudios [150, 153].

Las primeras evidencias acerca del efecto proliferativo de la IL-6 sobre las células glomerulares *in vivo* se obtuvieron de un ratón transgénico que llevaba el gen de la IL-6 fusionado con un promotor de la cadena pesada de la IgG humana, que desarrolló plasmacitosis y glomerulonefritis mesangioproliferativa, detectándose en el suero elevadas concentraciones de IL-6 e IgG1 policlonal [154].

En los glomérulos de algunos pacientes con glomerulonefritis proliferativa (como la nefropatía IgA) se ha demostrado, por tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal anti-IL-6, que sus células mesangiales son capaces de sintetizar IL-6 [152]. Estos valores se correlacionan con un incremento en el número de células glomerulares [155], mientras que los niveles de IL-6 urinarios de los pacientes con glomerulonefritis mesangioproliferativa pueden ser un indicativo de la severidad de la enfermedad [152].

Este efecto proinflamatorio de la IL-6 no se observa en otros tipos de enfermedades renales. Los estudios realizados en un modelo pasivo de nefritis nefrotóxica en ratas han demostrado un efecto antiinflamatorio de la IL-6 [155].

4.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LA NEFROPATIA IgA

La enfermedad de Berger, glomerulonefritis mesangial o, como más frecuentemente se le denomina, nefropatía de IgA, es una glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos que representa una de las enfermedades glomerulares primarias más comunes en el mundo [6, 156]. La primera caracterización de esta enfermedad se realizó mediante estudios de inmunofluorescencia de biopsias renales, detectándose depósitos mesangiales, intercapilares y difusos de inmunoglobulinas, con predominio de IgA [157].

4.1.- ASPECTOS CLÍNICOS:

La manifestación clínica predominante es la hematuria macroscópica recidivante, de tres a cinco días de duración, que puede venir acompañada de malestar general y dolor lumbar. En la mayoría de los casos los episodios de macrohematuria suelen estar asociados con infecciones inespecíficas del tracto respiratorio superior (generalmente faringoamigdalar) y en menor porcentaje con infecciones gastrointestinales, extirpación de amígdalas y vacunaciones, entre otras [158]. Otras anomalías menos frecuentes en los pacientes con nefropatía IgA son la proteinuria moderada y/o la hematuria microscópica.

Datos obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que existe una correlación entre la hematuria y la presencia de inmunocomplejos circulantes de IgA [159].

El pronóstico de la nefropatía IgA es en realidad más sombrío de lo que se pensaba inicialmente. El 50% de los pacientes a los 20 años de evolución mueren o requieren hemodiálisis. Esta nefropatía es responsable de alrededor del 10% de los pacientes que requieren transplante. La incidencia de hipertensión arterial en los pacientes con nefropatía IgA es relativamente alta (30-40% de los casos) y está considerada como un signo precoz de mala evolución de la enfermedad [156].

En las biopsias renales de estos pacientes se han detectado las siguientes características inmunohistoquímicas:

- Patrón histológico caracterizado por proliferación mesangial anormal (focal o difusa) y aumento de la matriz mesangial [160].

- Depósitos glomerulares: Principalmente IgA [157], subclase 1 [161], de naturaleza policlonal [162], cadena ligera de tipo λ [163] y forma molecular polimérica [164]. En un porcentaje menor se ha detectado IgG, IgM, C3 y otros factores de la vía alternativa del complemento. En los casos de larga duración existe acúmulo progresivo de fibronectina, laminina y colágeno de tipo IV [6, 165].

- Microscopía electrónica: depósitos electrondensos en áreas mesangiales y paramesangiales, entre las células y la membrana basal, y dentro de la matriz mesangial. En algunas ocasiones se pueden observar depósitos a lo largo de las paredes capilares periféricas, principalmente de localización subendotelial y un adelgazamiento y desdoblamiento de la membrana basal glomerular [156, 165].

4.2.- ASPECTOS INMUNOPATOLOGICOS:

4.2.1.- Anomalías en el sistema inmune

La característica serológica más importante de los pacientes con nefropatía IgA es la elevada concentración de IgA, mayoritariamente de la subclase IgA1, con un cierto predominio de cadenas ligeras de tipo λ [161, 166]. También destaca la presencia de

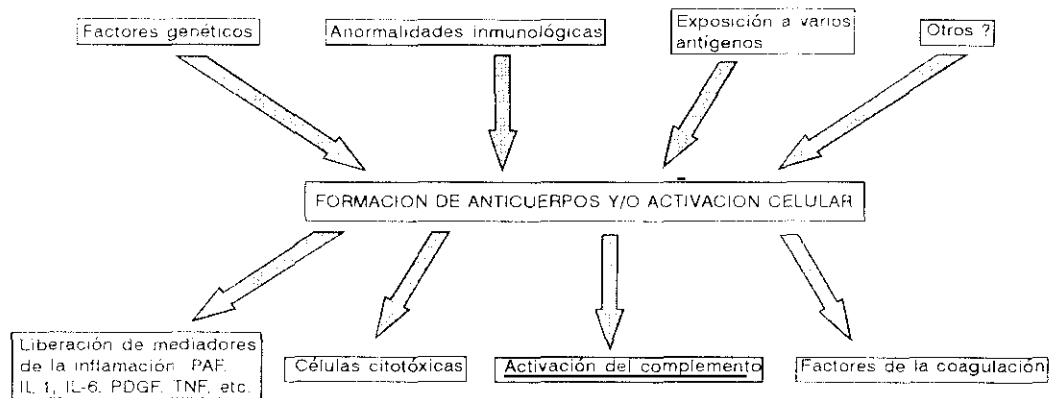
inmunocomplejos de IgA circulantes y un porcentaje elevado de moléculas de IgA polimérica [167] que, en algunos casos, puede presentar actividad de factor reumatoide [163]. La IgA circulante presenta un carácter aniónico muy restringido y, en ocasiones se han detectado defectos en la glicosilación de la molécula [163, 168].

El origen de la IgA presente en el área mesangial en la nefropatía IgA es un tema de gran controversia, pues algunos autores indican un origen de las mucosas y otros de la médula ósea [169]. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la producción incrementada de inmunoglobulinas, y concretamente de la IgA: un defecto en la actividad T supresora IgA específica, un incremento en la actividad T cooperadora IgA específica, una hiperactividad de las células B IgA específica y/o una estimulación incrementada de la producción de IgA a través de la función de los macrófagos [6, 163].

4.2.2.- Anomalías en el riñón

Existen varias hipótesis para explicar las causas del depósito de IgA en el mesangio. Posiblemente un descenso de la eliminación de la IgA (por deficiente degradación en el sistema reticuloendotelial), junto con un aumento en la producción de esta inmunoglobulina, son los responsables de las elevadas concentraciones de IgA circulantes, que consiguientemente se depositan en el área mesangial [170]. Estudios recientes relacionan las alteraciones en la glicosilación de la IgA de estos pacientes (principalmente en los residuos de Gal) con el aumento de los depósitos de IgA en el mesangio [168, 171]. Otros autores han sugerido que la IgA circulante podría reconocer un antígeno (residente o externo) presente en la célula mesangial, con la consiguiente activación del complemento, causando daño tisular a nivel local y hematuria [170].

Los sucesos implicados en la patogenia de la nefropatía IgA se resumen en el siguiente esquema:



La mayoría de los estudios realizados en los años 70 y 80 demostraron que la activación del complemento juega un papel fundamental en el desarrollo del daño renal en la nefropatía IgA, tanto por sí mismo como por su relación con las plaquetas, la coagulación y algunos productos inflamatorios. Como consecuencia de estos acontecimientos se produce la activación de las células glomerulares (epiteliales, endoteliales y mesangiales) y el daño renal finaliza en esclerosis [156, 170, 173].

En estos últimos años, la mayoría de las investigaciones se encaminaron al estudio de los factores glomerulares implicados en el daño renal. En este sentido, el papel activo que juegan las células mesangiales en la progresión de la glomeruloesclerosis es indiscutible. Las últimas investigaciones se han centrado en la interacción entre la IgA y las células mesangiales. En estudios *in vitro*, la IgA activa las células mesangiales, que sintetizan y liberan al medio exterior PAF, radicales libres del oxígeno y PGE_2 [172]. La interacción entre la IgA y las células mesangiales puede producirse también de forma indirecta, esto es, a través de otros factores, como algunas lectinas y proteínas de matriz, induciendo la síntesis de PGE_2 , TxB_2 y $\text{TNF}\alpha$ [174]. La interacción entre IgA y las proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágeno IV) es un proceso normal que está especialmente aumentado en la nefropatía IgA, y puede ser también responsable de la activación mesangial [175, 176].

Sin duda, los mayores avances en el conocimiento de los aspectos patológicos relacionados con la nefropatía IgA se han conseguido con el empleo de los modelos experimentales en animales [169]. En los modelos de glomerulonefritis mesangioproliferativas existe relación entre los niveles elevados de PDGF y TGF β y el aumento de la proliferación mesangial y los depósitos de matriz extracelular, respectivamente [177, 178]. Otras citocinas, como IL-6, IL-1 e IFN- γ , administradas de forma pasiva en un modelo de nefropatía de IgA, actúan de forma sinérgica en el desarrollo del daño glomerular, aumentando en los animales la hiper celularidad mesangial, la infiltración de las células proinflamatorias y la proteinuria y hematuria [179]. Se requieren más estudios que determinen otros mediadores solubles que pueden ejercer funciones paracrinas o autocrinas en el mesangio, actuando así como moduladores negativos o positivos del crecimiento celular y de la producción de matriz.

II.- OBJETIVOS

En los últimos años se ha avanzado bastante en el conocimiento de las características bioquímicas de las diferentes formas de la IgA, de sus funciones y de los receptores en las diferentes células. Los niveles elevados de IgA están muy relacionados con la patogenia de una gran variedad de enfermedades. Entre éstas destaca la nefropatía IgA, incluida en el grupo de glomerulonefritis mediadas por inmunocomplejos, que se caracteriza por un aumento en la concentración de IgA polimérica en el suero y por el depósito de inmunocomplejos de IgA1 en el mesangio glomerular. Numerosos estudios han intentado determinar la patogenia de esta enfermedad y, aunque se sospecha que los inmunocomplejos depositados y/o formados en el mesangio participan en el daño glomerular, las evidencias acumuladas hasta el momento son escasas. Algunos investigadores han demostrado que las células mesangiales se activan en presencia de inmunocomplejos, produciendo diversos mediadores de la inflamación. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en la caracterización de los receptores mesangiales de IgG, sin conocerse prácticamente nada respecto a los de IgA.

Los objetivos del presente trabajo van encaminados a determinar las características de la interacción entre la IgA y las células mesangiales, intentando demostrar si este receptor de IgA comparte algunas características comunes con algún tipo de los receptores de IgA descritos hasta el momento, concretamente con el receptor para la región constante y el receptor de asialoglicoproteínas.

En **primer lugar** estudiaremos las características bioquímicas de la interacción entre la IgA y las células mesangiales, determinando:

- Afinidad y condiciones del equilibrio de la unión.
- Especificidad de la unión
- Regiones de la molécula de la IgA implicadas en la interacción.

En **segundo lugar** abordaremos algunos aspectos moleculares del receptor para IgA presente en las células mesangiales:

- Peso molecular del receptor de la membrana de las células mesangiales.
- Características del mensajero del receptor.
- Modulación de la expresión del receptor, a nivel transcripcional (mRNA) y traduccional (proteína).

En **último lugar** nos centraremos en algunos de los aspectos funcionales de la interacción entre las células mesangiales y la IgA, determinando:

- Cinética de internalización y degradación de la proteína unida.
- Mecanismos de transducción de la señal: variaciones de la concentración de calcio intracelular.
- Producción de mediadores de la inflamación, en concreto de las citocinas factor de necrosis tumoral e interleucina 6.
- Efectos de la IgA sobre la proliferación de las células mesangiales.

III.- MATERIALES Y METODOS

1.- REACTIVOS

SIGMA CHEMICAL CORPORATION, St. Louis, USA.

Colagenasa tipo Ia
Albúmina de suero bovino (BSA)
Acido etilenglicol-bis-(β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA)
Acido etilendiamino tetraacético (EDTA)
Cicloheximida, Actinomicina D
Polimixina B, Lipopolisacárido bacteriano (LPS)
IgG humana
Marcadores de peso molecular de las columnas de cromatografía
8-(N,N-dietilamino)octil 3,4,5-trimetoxibenzoato (TMB-8)
Fura 2/AM, Toxina de pertussis, Estaurosporina
Orosomucoide
Neuraminidasa de *Clostridium Perfringens* unida a bolas de agarosa
Galactosa (Gal), N-Acetilgalactosamina (GalNAc), N-Acetilglucosamina (GlcNAc)
Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF)
Nonidet P-40
Iodacetamida, Antipafina, Quimostatina, Leupeptina, Pepstatina A
N-laurilsarcosina
Dietil pirocarbonato
Agarosa, MOPS, Ficoll, PVP
RNasa, xilen cianol
Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES)

GIBCO BRL, Paisley, Scotland, Gran Bretaña.

Medio de cultivo Rowell Park Memorial Institute (RPMI) 1640
Glutamina
Penicilina/estreptomicina
Tripsina-EDTA
Suero de ternera fetal

BIORAD LABORATORIES, Richmond CA, USA.

Acrilamida, Bis-acrilamida

Dodecil sulfato sódico (SDS)

Persulfato amónico, TEMED

Glicina

Marcadores de electroforesis de alto y bajo peso molecular

DIFCO LABORATORIES, Detroit MI, USA.

Bacto-Agar

Agar chocolate

Extracto de levadura

Bacto-triptona

COSTAR, Cambridge MA, USA.

Frascos y placas de plástico para cultivos celulares

PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY AB, Uppsala, Suecia.

Aminohexil-Sepharosa 4B (AH-Sepharosa)

Ultrogel Aca22

Dietilaminoetil (DEAE) celulosa

Sephacryl S200 HR

Sephadex G-50

PIERCE CHEMICAL COMPANY, Rockford IL, USA.

Sulfosuccinimidil-3-(4-hidroxifenil) propionato

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, Mannheim, Alemania.

DNA de esperma de arenque

Interleucina-6 recombinante humana

NEW ENGLAND RESEARCH PRODUCTS (NEN), Willmington DE, USA.

^{125}I Na

^{32}P -dCTP

$[^3\text{H}]$ metil-timidina

MERCK, Darmstadt, Alemania.

Azul de Coomassie, azul de bromofenol, violeta cristal

Tris-(hidroximetil)-aminoetano (Tris)

β -mercaptoetanol

Glutaraldehído, formaldehído

Acido cítrico

Etanolamina, KSCN

NaN_3

Cloramina T, metabisulfito sódico, KI

Na_2HPO_4 , KH_2PO_4

KCl, CaCl_2

MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Borato sódico

Triton X-100

Acido tricloroacético (TCA)

Glicerol

ENDOGEN, Boston MA, USA.

Anticuerpos policlonales anti-TNF α , anti-IL-6, anti-IL-1

SCHARLAU S.A., Barcelona.

D-glucosa anhidra

Metanol, etanol, isopropanol

Acido acético, NaOH

PANREAC, MONTPLET & ESTEBAN S.A., Barcelona.

NaHCO₃

HCl, NaCl

Cloroformo, Acido Nítrico

FLUKA

Acido siálico

Fenol

Formamida

NOVO NORDISK PHARMA S.A., Madrid.

Insulina humana recombinante

IMMUNOGENEX, Los Angeles CA, USA.

TNF α recombinante humano

OPERON S.A., Zaragoza.

Anticuerpos policlonales anti-inmunoglobulinas

2.- TAMPONES Y SOLUCIONES

TAMPON DULBECCO ESTERIL

KCl	2.6 mM
NaCl	137 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
Na ₂ HPO ₄	8.0 mM
glucosa	5.6 mM
Ajustar a pH 7.5-7.6 con NaOH	
Esterilizar en autoclave (130°C, 1 Bar, 20 min)	

TAMPON FOSFATOS 0.5 M

Na ₂ HPO ₄	390 mM
KH ₂ PO ₄	110 mM

TAMPON FOSFATO-SALINO (PBS)

NaCl	150 mM
fosfatos 0.5 M	10 mM (20 ml/l)
Comprobar que el pH está 7.3	

TAMPON CARBONATO/BICARBONATO 0.1 M

NaHCO ₃	100 mM
NaCl	500 mM
Ajustar a pH 8.5 con una solución:	
Na ₂ CO ₃	100 mM
NaCl	500 mM

TAMPON TRIS-SALINO (TBS)

Tris	150 mM
NaCl	150 mM
KCl	5 mM
Ajustar a pH 7.4 con HCl	

TAMPON ACETICO-ACETATO 0.1 M

acetato sódico 0.6 M	435 ml/l
ácido acético 0.6 M	130 ml/l
Comprobar que el pH está a 5.0	

TAMPON HEPES-SALINO (HEPES)

HEPES	2 mM
NaCl	150 mM
KCl	5 mM
Ajustar a pH 7.4 con NaOH	

TAMPON KREBS-HENSELEIT-HEPES (KHH)

NaCl	130 mM
KCl	5.3 mM
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	2 mM
NaH ₂ PO ₄	1.2 mM
glucosa	5.5 mM
HEPES	20 mM
BSA	0.5 %
Ajustar a pH 7.3 con KOH	

TAMPONES DE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

- de muestras:

Tris	0.08 M pH 6.8
glicerol	10 %
SDS	1 %
azul de bromofenol	0.005 %

- de desarrollo:

Tris	0.025 M
glicina	1.92 M
SDS	1 %

TAMPONES DE ELECTROFORESIS DE RNA

- desnaturalizante:

formamida desionizada	50 %
formaldehído	6 %
MOPS	1x

- de muestras:

glicerol	30 %
azul de bromofenol	0.25 %
xilen cianol	0.25 %

SOLUCION DE TRITON X-100 AL 1%

Se prepara inicialmente una solución de 10% de Triton X-100 y 5% de HNO_3 en agua destilada, y después se diluye ésta solución hasta el 1% en tampón HEPES pH 7.4.

SOLUCION AMONICAL DE NITRATO DE PLATA 0.05 M

Añadir (muy lentamente y agitando) 4 ml de AgNO_3 1.2 M a 21.3 ml de agua bidestilada conteniendo 1.3 ml de NH_4OH y 0.2 ml de NaOH 10 N. Después de la disolución, completar hasta 100 ml con agua bidestilada.

MEDIO DE LURIA-BERTANI

extracto de levadura	5 mg/l
bacto-triptona	10 mg/l
NaCl	10 mg/l

SOLUCIONES DE MINIPREP

- solución I:

glucosa	50 mM
Tris-HCl	25 mM pH 8.0
EDTA	19 mM

- solución II:

NaOH	0.2 N
SDS	1 %

SOLUCION DE LISIS PARA EXTRACCION DE RNA

isotiocianato de guanidina	4 M
citrato sódico pH 7.0	25 mM
N-laurilsarcosina	0.5 %
β -mercaptoetanol	0.1 M

SOLUCION DE DENHART

Ficoll	0.02 %
BSA	0.02 %
PVP	0.02 %

SOLUCIÓN 20X SSC

NaCl	3 M
citrato sódico	0.3 M

3.- METODOS EXPERIMENTALES

3.1.- CULTIVOS CELULARES

3.1.1.- Cultivo de células mesangiales de rata:

Para el cultivo de células mesangiales glomerulares se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 100-150 gramos de peso [180]. Los riñones se extrajeron en condiciones estériles, se decapsularon y se separó la corteza de la médula. La corteza troceada se pasó por un tamiz de 150 μm y el homogeneizado resultante se lavó sobre un tamiz de 50 μm con tampón Dulbecco estéril. Posteriormente se centrifugó a 190g durante 1 minuto, desechando el sobrenadante. El precipitado rico en glomérulos se resuspendió en Dulbecco y se incubó con 500 U/ml de colagenasa (tipo IA) a 37°C durante 30 minutos, agitando periódicamente la suspensión. La digestión con colagenasa se paró en frío y añadiendo medio de cultivo Rowell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 tamponado con 25 mM de HEPES, suplementado con glutamina 2mM, 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina (RPMI-HEPES) y enriquecido con 10% de suero de ternera fetal (STF). La suspensión se pasó a través de otro tamiz de 50 μm y se centrifugó a 600g durante 10 minutos. Los glomérulos obtenidos se resuspendieron en medio RPMI-HEPES con 20% de STF, se sembraron sobre frascos de cultivo de plástico y se incubaron a 37°C en una estufa humidificada y con un 5% de CO_2 . A los cuatro días de la siembra se reemplazó el medio de cultivo de las placas por medio nuevo, conteniendo 10% STF y a partir de este momento se realizaron cambios periódicos de tres veces por semana.

Las células mesangiales aparecen entre el día siete y el catorce después de la siembra y, por las condiciones del cultivo, los demás tipos celulares glomerulares (sobre todo epiteliales) van muriendo, de forma que aproximadamente a los 18-20 días se obtienen monocapas confluentes de células mesangiales.

Para los estudios de unión de proteínas marcadas se utilizaron células mesangiales sembradas sobre frascos de cultivo de plástico de 25 cm^2 de superficie. Para aislamiento de RNA y de receptores de membrana celular se emplearon frascos de 75 cm^2 . En ambos casos los experimentos se realizaron en los días 18-20 del cultivo inicial. En otro tipo de

experimentos se utilizaron células mesangiales subcultivadas, es decir, tripsinizadas (incubación de 2 minutos a 37°C con una solución de tripsina al 0.05% y de EDTA al 0.02%) y sembradas sobre placas de cultivo.

3.1.2.- Cultivo de células mesangiales humanas:

Para el cultivo de células humanas se emplearon riñones perfundidos que habían sido desechados para trasplante. Los glomérulos se extrajeron según la técnica anteriormente descrita y se sembraron sobre frascos de 75 cm² en medio RPMI-HEPES con 20% de STF y un suplemento adicional de 0.06 U/ml de insulina. A los siete días de cultivo se reemplazó el medio de los glomérulos adheridos al plástico y, aproximadamente a los veinte días, cuando las células mesangiales alcanzaron confluencia, se despegaron por tratamiento con tripsina-EDTA. Los pases sucesivos se sembraron con una relación 1:3 o 1:4 y se hicieron subcultivos cada 8-10 días, renovando el medio, en cualquier caso, cada 2-3 días.

Todos los experimentos con células mesangiales humanas se realizaron entre los pases tercero y séptimo, tanto en células confluentes como subconfluentes.

3.1.3.- Caracterización de las células mesangiales:

Por microscopía de contraste de fase se observó, como característica anatómica de estas células, la presencia de prolongaciones citoplasmáticas irregulares; a veces estas proyecciones salían solo de un extremo de la célula, quedando el otro redondeado, sin prolongarse. El núcleo, más o menos irregular, se apreció de forma patente en estas células. No se observaron formas características de células endoteliales o epiteliales glomerulares en el momento de realizar los experimentos.

Mediante estudios de inmunohistoquímica, las células presentaron tinción positiva con anticuerpos específicos para desmina y vimentina (marcadores característicos de células miogénicas) y al antígeno Thy 1. La tinción para el factor VIII y para citoqueratinas fue negativa, excluyendo de esta forma la presencia de células endoteliales y epiteliales,

respectivamente. También se excluye la contaminación por macrófagos pues la tinción con antígeno la fue negativa [77].

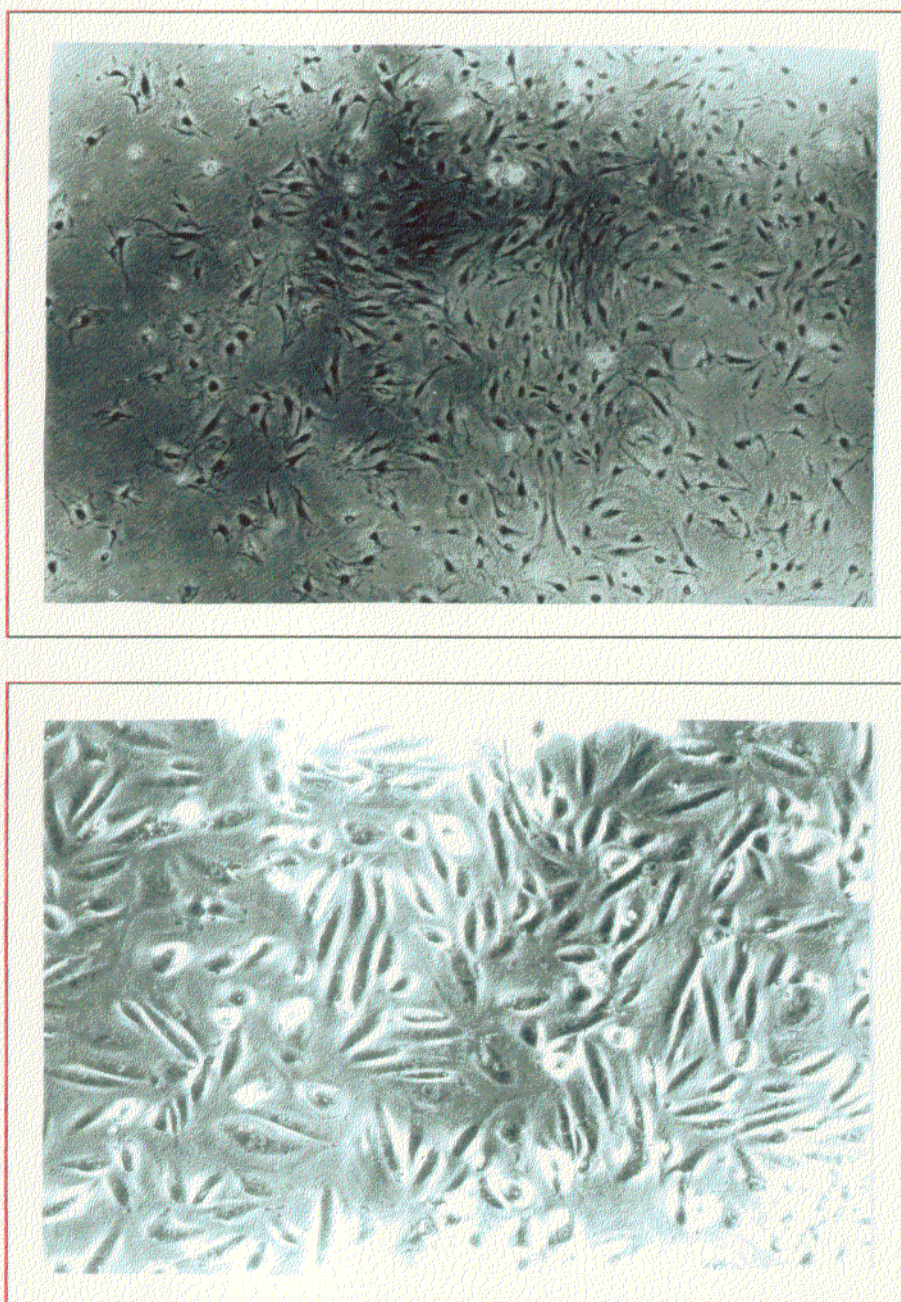


Figura 1: Aspecto al microscopio óptico de las células mesangiales de rata (arriba) y de las células mesangiales humanas (abajo) en cultivo

3.1.4.- Aislamiento de macrófagos peritoneales de rata:

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron de ratas Sprague-Dawley anestesiadas con éter. Se realizaron 3 lavados consecutivos de la cavidad peritoneal con 10 ml de tampón PBS y las células recogidas se lavaron dos veces en el mismo tampón, se resuspendieron a una concentración de 10^5 células/ml en RPMI-HEPES conteniendo 0.5% de albúmina de suero bovino (BSA, fracción V) y se sembraron sobre placas de 6 pocillos. Al cabo de 2 horas de incubación a 37°C se retiraron las células no adheridas al plástico y se contaron, para llevar un control del número de células en cada pocillo.

3.2.- AISLAMIENTO DE PROTEINAS

3.2.1.- Técnicas generales:

3.2.1.a.- Inmunodifusión doble dimensional:

Se utilizaron placas Petri con agar al 1% en PBS. En cada placa se realizaron unos pocillos enfrentados de 0.5 cm de diámetro en los que después se depositaron el antígeno y el anticuerpo. Ambas proteínas migran por simple difusión la una hacia la otra, observándose líneas o bandas de precipitación cuando alcanzan el punto de equivalencia, aproximadamente después de 24-48 horas de incubación a temperatura ambiente y en cámara húmeda [181].

3.2.1.b.- Inmunoelectroforesis:

La inmunoelectroforesis se realizó en placas de 11x15 cm de agarosa al 1.5% en tampón veronal 0.035 M a pH 8.6 [182]. En cada pocillo se cargaron de forma alternada 3 μ l de muestra o de suero control (con una gota de azul de Coomassie para poder seguir

la migración de la albúmina). La electroforesis se realizó en una cubeta horizontal con tampón veronal 0.05 M a pH 8.6, durante 1 hora a 100 voltios. Después de la separación de las proteínas se procedió a su inmunoprecipitación. Se cargaron en las trincheras 100 μ l de los diferentes anticuerpos y se incubaron durante 24 horas en una superficie plana, a temperatura ambiente y en atmósfera saturada de humedad. Al cabo de este tiempo se observaron los arcos de precipitación. Las placas se lavaron varias veces con solución salina 0.15 M a pH 7.3 para eliminar las proteínas no precipitadas y luego con H₂O para eliminar las sales; se dejaron secar a temperatura ambiente hasta obtener una fina película de agarosa. Se realizó entonces la tinción de las placas con azul de Coomassie al 0.5 % y luego se decoloraron con una solución de etanol al 95 % y ácido acético al 5 % hasta que sólo quedaran teñidas las bandas de precipitación.

3.2.1.c.- Electroforesis en geles de poliacrilamida:

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) es una técnica de gran resolución y sensibilidad para comprobar la pureza de las proteínas aisladas. Para la preparación de los geles se siguió la metodología descrita por Laemmli [183], a partir de una solución de acrilamida al 30% y bisacrilamida al 0.8%. Los geles de desarrollo se prepararon a una concentración final de acrilamida del 10% en tampón Tris-HCl 0.037 M a pH 8.8 y SDS al 1%, y los geles de concentración al 5% en tampón Tris-HCl 0.125 M a pH 6.8 y SDS al 1%. Como iniciador de la polimerización se utilizó 0.1 mg/ml de persulfato amónico (116 μ l para el gel de desarrollo y 25 μ l para el concentrante) y como catalizador TEMED (23 y 5 μ l para cada gel, respectivamente).

Las muestras se aplicaron en los pocillos del gel (30-40 μ g en un volumen máximo de 100 μ l) con tampón de muestras de electroforesis (ver sección de *Tampones y Soluciones*) en presencia o ausencia de β -mercaptoetanol como agente reductor. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de desarrollo, utilizando cubetas refrigeradas (BioRad, modelo Protean II), a una intensidad constante de 20 mA para el gel de concentración y de 30 mA para el de desarrollo, durante 4-6 horas.

En algunos casos los geles se tiñeron con una solución de 0.15 mg/ml de azul de

Coomassie en metanol/acético/agua (7:10:1.2) durante 1 hora y se decoloraron con metanol/acético/agua (4:1:10). En los casos en que fue necesaria una mayor sensibilidad, los geles se tiñeron con plata mediante el método de las diaminas [184]. Las proteínas se fijaron con una solución de etanol al 5% y ácido acético al 5% en agua durante 16 horas. Los geles se incubaron con glutaraldehído al 10% durante 30 minutos, se lavaron con H₂O para eliminar el exceso de glutaraldehído y se sumergieron durante 10 minutos en una solución amoniacal de nitrato de plata 0.05 M, lavando el exceso de plata con agua. La imagen se desarrolló con una solución de 0.1 g/l de ácido cítrico y 1 ml/l de formaldehído al 37%. Como parador de la reacción se utilizó ácido acético al 5%.

3.2.1.d.- Unión de proteínas a Sepharosa:

Se utilizó como soporte un gel de AH-Sepharosa 4B, al que se le unieron diferentes proteínas (BSA, IgG, IgA, suero anti-IgG), según la cromatografía de afinidad requerida [185]. Para preparar el inmunoadsorbente se procedió en primer lugar a lavar la Sepharosa con NaCl 0.5M, llevándola después a un tampón carbonato-bicarbonato 0.1M a pH 8.5. Para activar los grupos aminohexil del gel se incubó éste con glutaraldehído al 2.5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar el glutaraldehído no unido se incubó la AH-Sepharosa con la proteína (a una concentración de 10 mg de proteína/ml de gel hidratado) durante 18 horas a 4°C. Los posibles grupos activos libres fueron inactivados incubando con etanolamina 1M a pH 8.0, durante 2-3 horas a temperatura ambiente. La proteína no unida covalentemente al gel se eliminó mediante varios lavados, alternando tampón carbonato-bicarbonato y KSCN 2M a pH 7.0. Finalmente, la AH-Sepharosa-proteína se resuspendió en tampón PBS con NaN₃ al 0.05%, a pH 7.3 y se almacenó a 4°C hasta su uso. En todos los casos la eficiencia de la unión de la proteína a la Sepharosa fue de aproximadamente un 90%.

3.2.1.e.- Marcaje de proteínas por el método de la cloramina T:

En el marcaje de proteínas con ^{125}I se usó como oxidante la cloramina T, según el método de Greenwood [186] para conseguir actividades específicas altas, pero modificado para evitar desnaturalización de proteínas [187]. Para ello, se incubaron 10 mg de proteína (en 500 μl de PBS) con 1mCi de Na^{125}I (en 20 μl de tampón fosfatos 0.05 M a pH 7.3) y con 100 μl de cloramina T (1 mg/ml en fosfatos 0.05 M). La reacción transcurrió durante 40 segundos a temperatura ambiente y 1 minuto a 4°C, parándose con la misma cantidad de metabisulfito sódico y un exceso de KI (200 μl de una solución 1 M) con 1 % de BSA. Si la proteína iba a ser agregada posteriormente, se omitió la adición de BSA en el tampón, pues ésta impide la agregación. La eliminación del ^{125}I no incorporado a la proteína se realizó mediante diálisis frente a PBS.

3.2.2.- Aislamiento de inmunoglobulinas:

3.2.2.a.- Aislamiento de IgM:

Esta inmunoglobulina se obtuvo del suero de un paciente con mieloma de IgM. Se separó del resto de las proteínas séricas mediante diálisis frente a H_2O destilada. El precipitado euglobulínico se diluyó en tampón PBS y se analizó por cromatografía de penetrabilidad en una columna de Ultrogel AcA 22, equilibrada con PBS. La pureza de la IgM se determinó por inmunodifusión doble frente a antisuero anti-cadenas μ e inmunoelectroforesis [188].

3.2.2.b.- Aislamiento de IgA:

La IgA humana se obtuvo del suero de un paciente con mieloma de IgA, que presentaba elevadas concentraciones de IgA monomérica del tipo IgA1, con cadenas ligeras de tipo kappa. De una de las plasmaféresis realizadas al paciente se obtuvo plasma, que se

trató con trombina (100 unidades/ml) y CaCl_2 1M, eliminando de esta forma el coágulo blanco.

El suero así obtenido se diluyó 1/2 con tampón PBS y se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% (peso/volumen). Las proteínas precipitadas (fracción γ -globulínica) se centrifugaron a 3000g durante 30 minutos, se redisolieron en PBS y se dializaron frente a tampón fosfatos 0.015 M, pH 7.5.

La IgG, IgA monomérica e IgA polimérica se aislaron de la solución proteica por cromatografía de intercambio iónico en una columna K50/30 cargada con dietilaminoetilcelulosa (DEAE) equilibrada inicialmente con tampón fosfatos 0.015M a pH 7.5. La mayor parte de la proteína que no se unió a la matriz cargada pertenecía a la clase IgG. La IgA monomérica se eluyó con tampón fosfatos 0.05 M a pH 7.0. Para eluir la pequeña cantidad de IgA polimérica que contenía el suero del mieloma, se utilizó un gradiente de molaridad, desde fosfatos 0.05 M a pH 7.0, hasta NaCl 0.2 M en tampón fosfatos 0.05 M a pH 7.5. La solución de proteínas así obtenidas se dializó frente a PBS.

Para eliminar posibles trazas de IgG que podían haber eluido junto con la IgA, se realizó una cromatografía de afinidad pasando la fracción de la IgA a través de una columna de Sepharosa unida a un anticuerpo policlonal anti-IgG. La proteína no retenida (IgA) se concentró a 10 mg/ml en un concentrador Amicon (Amicon Co., Lexington, MA, USA) con una membrana PM 10 (que retiene moléculas con un peso molecular superior a 10kDa). Mediante técnicas de inmunoelectroforesis e inmunodifusión doble dimensional se comprobó que la fracción de IgA se encontraba libre de otras proteínas séricas [65].

El peso molecular de la IgA se estimó mediante SDS-PAGE y por cromatografía de penetrabilidad, utilizando una columna K26/70 cargada con Ultrogel AcA 22 previamente calibrada con los marcadores azul dextrano (V_0), IgM (900 kDa), ferritina (440 kDa), IgG (150 kDa), BSA (64 kDa) y citocromo c (12 kDa). La secuencia del aislamiento de IgA se indica en la figura 2.

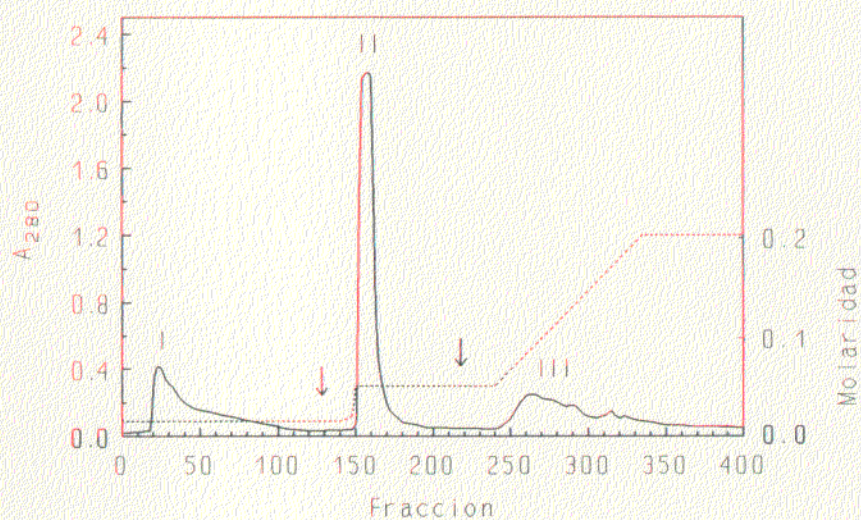
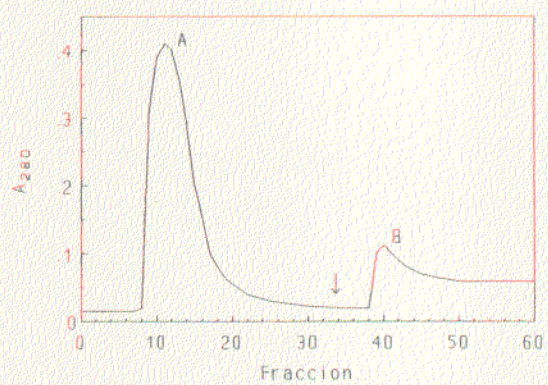
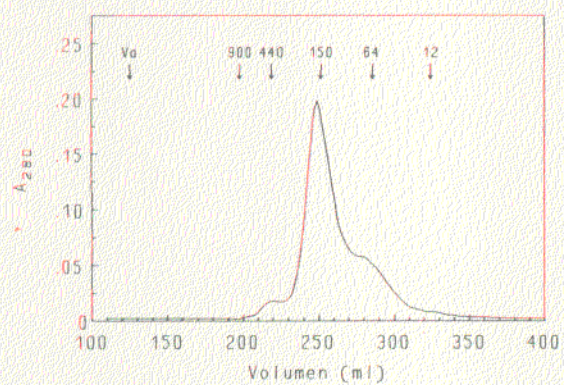
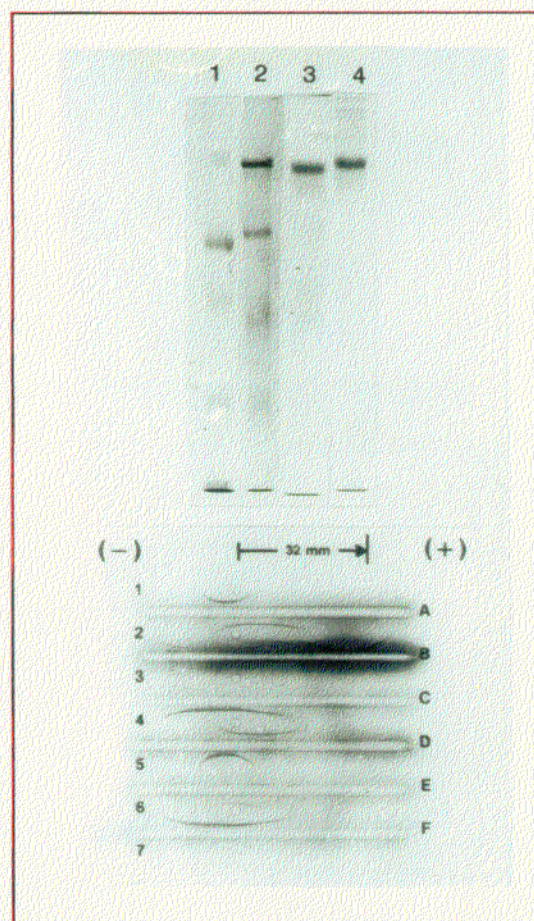
A**B****C****D**

Figura 2 (página anterior): Aislamiento de IgA humana: (A) Perfil de elución de las inmunoglobulinas de una columna de celulosa DEAE. La fracción I (IgG) eluye con tampón fosfatos 0.015M, pH 7.5, la fracción II (mayoritariamente IgA monomérica) con fosfatos 0.05M, pH 7.0 y la fracción III (IgA polimérica) con un gradiente de molaridad desde fosfatos 0.05M, pH 7.0, hasta NaCl 0.2M en fosfatos 0.05M, pH 7.5. Las flechas indican el cambio del tampón de elución y la línea discontinua el cambio de molaridad. (B) Cromatografía de afinidad de la fracción II, en una columna de Sepharosa-anti-IgG. La fracción A no queda retenida en la columna (IgA) y la fracción B (IgG) eluye con KSCN 2M tamponado con fosfatos 0.01M a pH 7.0. (C) Cromatografía de penetrabilidad de la IgA (fracción A) en una columna con Ultrogel AcA22. La posición de los marcadores se indica en la parte superior: azul dextrano (V_0 , 3000 kDa), IgM (900 kDa), ferritina (440 kDa), IgG (150 kDa), BSA (64 kDa) y citocromo c (12 kDa). (D) Electroforesis en 12% de acrilamida de la IgA monomérica y polimérica aisladas. En la parte inferior aparece un gel de inmunoelectroforesis: en los pocillos impares se cargó IgA y en los pares un suero humano de control; en las trincheras A y D se cargó suero anti-IgA, en la B se cargó suero anti-suero humano total, en las C y F se puso anti-IgG y en la trinchera E, suero anti-IgM.

Los fragmentos Fc y F(ab) de la IgA se obtuvieron por digestión con la proteasa de IgA1 de *Haemophilus Influenzae* (HK 50; 35891), bacteria suministrada por la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA TCC 35891), capaz de romper las uniones prolil-seril de los residuos 231 y 232 situados en la región bisagra de la inmunoglobulina. Las bacterias se crecieron durante 24 horas a 37°C sobre placas de agar chocolate en cuya superficie se había colocado una membrana de diálisis esterilizada. Luego se extrajeron las membranas de diálisis, se lavaron con PBS y las bacterias se eliminaron por centrifugación. El extracto con la proteasa de IgA1 se concentró y se almacenó a -20°C.

La IgA (10 mg/ml) se incubó durante 24 horas a 37°C con la proteasa de IgA1 (relación 10:1). Los fragmentos de IgA se separaron utilizando una columna K16/90 cargada con Sephacryl S200 HR y se analizaron por SDS-PAGE e inmunoelectroforesis, obteniéndose dos proteínas, el fragmento Fc, de 62 kDa y el fragmento F(ab), de 48 kDa [2], como se muestra en la figura 3.

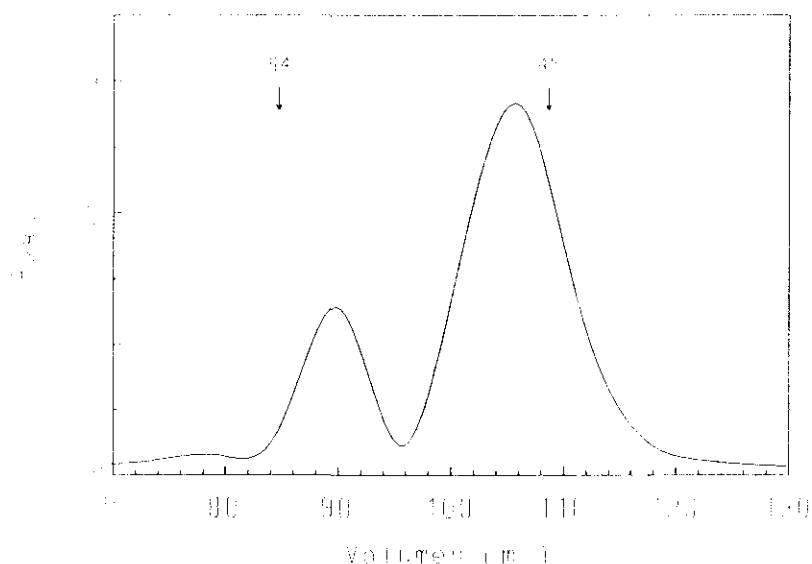


Figura 3: Fragmentos de IgA: Perfil de elución de la IgA digerida con la proteasa de IgA1 (de *Haemophilus Influenzae*) en una columna cargada con Sephacryl S200 HR equilibrada con PBS. Los fragmentos Fc y F(ab) presentan un peso molecular aproximado de 62 kDa y 48 kDa, respectivamente. Las flechas indican la posición de los marcadores: BSA (64 kDa) y OVA (45 kDa).

3.2.2.c.- Preparación de agregados de un tamaño definido:

Para la obtención de agregados utilizamos una IgG humana de origen comercial y la IgA monomérica humana purificada, a una concentración de 10 mg/ml en tampón PBS. La agregación se realizó por calentamiento a 63°C durante 30 minutos (para IgG) y 150 minutos (para IgA). Posteriormente se centrifugaron las preparaciones a 1500g durante 15 minutos con el fin de eliminar los agregados insolubles. Para separar los agregados solubles de la proteína no agregada, se pasaron a través de una columna cargada con Ultrogel AcA 22 y equilibrada en tampón TBS a pH 7.4, conteniendo 0.5% de BSA para prevenir la autoagregación [65]. De esta forma se obtuvieron agregados solubles de aproximadamente $1-2 \times 10^3$ kDa (determinado por gradiente de sacarosa) que se almacenaron en alícuotas a una temperatura de -20°C (figura 4).

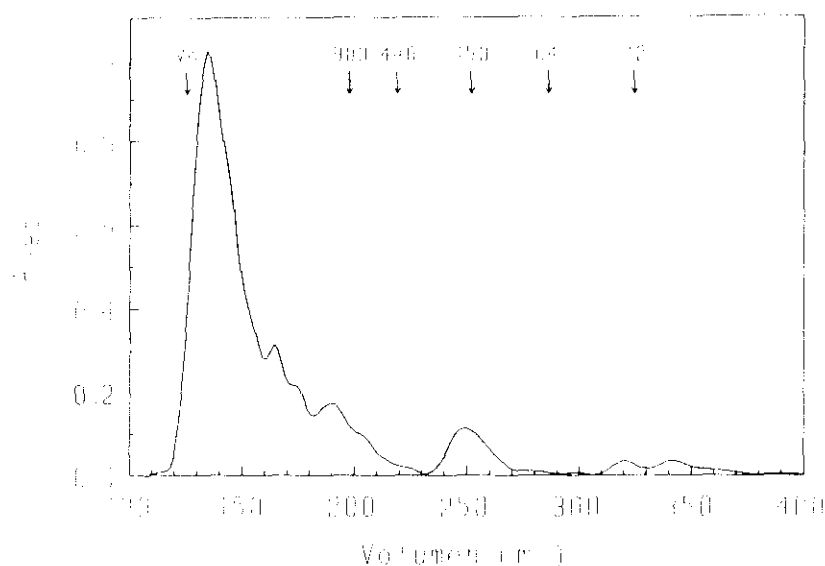


Figura 4: Aislamiento de los agregados de IgA: Perfil de elución de los agregados de IgA monomérica de una columna cargada con Ultrogel AcA22, equilibrada en tampón TBS con BSA al 0.5%, pH 7.4. El volumen de elución de la fracción de los agregados es cercano al volumen de exclusión de la columna (V_0). La IgA monomérica sin agregar eluye a un volumen correspondiente a un peso molecular aproximado de 160 kDa. La posición de los marcadores se indica en la parte superior de la figura: azul dextrano (V_0 , 3000 kDa), IgM (900 kDa), ferritina (440 kDa), IgG (150 kDa), BSA (64 kDa) y citocromo c (12 kDa).

3.2.2.d.- Desialización de proteínas:

La desialización consiste en la eliminación de los residuos terminales de ácido siálico (o neuramínico) contenidos en las cadenas de oligosacáridos de una glicoproteína. La IgA monomérica y el orosomucoide, también denominada α_1 -glicoproteína, se incubaron con neuraminidasa procedente de *Clostridium perfringens* unida a bolas de agarosa, con una relación de 0.06 U de enzima / 2 mg de proteína [30]. La incubación se realizó en tampón acetato sódico 0.1 M a pH 5.0, durante 6 horas a 37°C. El enzima insoluble se eliminó mediante centrifugación y las proteínas del sobrenadante se dializaron frente a PBS.

Para determinar el grado de desialización se empleó el método colorimétrico del ácido tiobarbitúrico [189], utilizando una curva de referencia construida con ácido siálico. La eficiencia de la eliminación del ácido siálico contenido en la molécula de IgA fue de aproximadamente un 70%, mientras que el orosomucoide perdió un 90% de su contenido

en ácido siálico. La desialización no afectó de ninguna forma a las propiedades inmunoquímicas de la molécula de IgA, como se demostró mediante inmunodifusión doble y SDS-PAGE.

3.3.- ENSAYOS DE UNION Y CATABOLISMO DE PROTEINAS MARCADAS

3.3.1.- Unión de proteínas marcadas a células mesangiales:

En este tipo de experimentos se utilizaron células mesangiales de rata cultivadas hasta confluencia (18-21 días) en frascos de 25 cm². Las células se lavaron con medio RPMI-HEPES sin STF y luego se incubaron durante 2 horas a 37°C con medio conteniendo 1% de STF. Transcurrido este tiempo, se lavaron con PBS frío conteniendo 0.5% de BSA y 0.05% de NaN₃ (PBS-BSA) y se equilibraron en el mismo tampón durante 1 hora a 4°C.

Los estudios de unión de proteínas marcadas se llevaron a cabo por duplicado, incubando las células con una concentración fija de proteína marcada a diferentes tiempos (entre 5 minutos y 4 horas), o a 60 minutos en presencia de cantidades crecientes de proteína, en 2 ml de PBS-BSA y a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación el medio fue aspirado, las células se lavaron tres veces con PBS-BSA frío y se despegaron de los frascos de cultivo por tratamiento con NaOH 1N durante 15 minutos a 60°C. La radiactividad contenida en la fracción celular se determinó con un contador gamma (LKB) y nos permitió calcular la concentración de proteína marcada unida.

La unión inespecífica se determinó en presencia de 100 veces en exceso de proteína no marcada. En cada experimento se tuvo también en cuenta el fondo, determinado como la radiactividad retenida en un pocillo que no contenía células. Ambos datos se restaron al total unido para calcular la unión específica de las proteínas a las células.

Para cada experimento se reservó un frasco de cultivo con células, que fueron despegadas por tratamiento con tripsina-EDTA, para determinar después por conteo al microscopio el número de células aproximado por cada punto.

En algunos casos los experimentos de unión se realizaron en un sistema homólogo, es decir, IgA humana marcada y células mesangiales humanas. La metodología seguida fue análoga a la descrita para las células mesangiales de rata.

Como control positivo de los ensayos de unión se utilizaron los macrófagos peritoneales de rata, células en las que ya se ha demostrado la existencia de receptores para IgA [32, 56]. Como control negativo utilizamos un tipo de célula de origen no hematopoyético en la que no se han detectado receptores para inmunoglobulinas, la línea de fibroblastos renales de rata NRK49F (ATCC CRL1570). En ambos tipos celulares se determinó el grado de unión de la ^{125}I -IgA, tanto en ausencia como en presencia de proteína sin marcar.

3.3.2.- Cálculo de la constante de equilibrio:

Con los datos obtenidos en el ensayo de unión se construyeron los gráficos de Scatchard [90], basándose en la ecuación

$$\frac{B}{F} = K_a (n - B)$$

donde:

B = número de moles unidos en el equilibrio

F = número de moles libres

n = número de sitios de unión

K_a = constante del equilibrio o de afinidad.

En nuestro caso, la representación gráfica de B/F frente a B (expresado en $\mu\text{g/ml}$) nos permitió calcular la constante aparente de asociación (la pendiente de la línea de regresión) expresada en M^{-1} , considerando el peso molecular de la IgA como 170 kDa. El número de sitios de unión por célula se determinó a partir del punto de corte de la recta de regresión con el eje de las abscisas, teniendo en cuenta el peso molecular de la IgA, el número de Avogadro (6.023×10^{23} moléculas/mol) y el número de células por punto (aproximadamente 2.5×10^5).

3.3.3.- Ensayos de inhibición:

Para determinar la especificidad de la unión de las proteínas a las células mesangiales, se realizaron diversas pruebas de inhibición con diferentes dosis de proteínas no marcadas (IgA, IgG, IgM, IgA desializada, orosomucoide desializado y fragmentos Fc y F(ab) de la IgA) o de carbohidratos (Gal, GalNAc y GlcNAc). Se realizó una incubación a 4°C durante 45 minutos en presencia de los inhibidores previa a la adición de la proteína marcada. Los datos se expresan como porcentaje con respecto al control de células en ausencia de inhibidor.

3.3.4.- Catabolismo de las proteínas marcadas:

Los estudios de internalización y degradación de las proteínas unidas se realizaron con células mesangiales de rata confluentes cultivadas en placas de 6 pocillos. En el día del experimento se lavaron con PBS frío y se mantuvieron durante 1 hora a 4°C en tampón HEPES conteniendo CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM, 0.5% de BSA y 0.1% de glucosa, pH 7.4 (HEPES-BSA). Después se añadió 1 ml de HEPES-BSA conteniendo 2 µg/ml de las proteínas marcadas (IgA e IgG, tanto monoméricas como agregadas por calor). La unión se realizó a 4°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se eliminaron las proteínas no unidas a las células mediante dos lavados con PBS frío y se añadió 1 ml de tampón HEPES-BSA, incubando las células a 37°C para permitir la endocitosis de las proteínas. A diferentes intervalos de tiempo (desde 0 hasta 120 minutos) se extrajo el medio y las células se enfriaron sobre hielo, se lavaron con PBS frío y se solubilizaron con 1 ml de Triton X-100 (30 minutos a temperatura ambiente). Las proteínas presentes en el sobrenadante inicial y en el primer lavado se precipitaron con TCA (10% de concentración final), separando precipitado y sobrenadante mediante centrifugación a 1200g durante 30 minutos.

Se cuantificó entonces para cada tiempo (t_i) la radiactividad precipitada (P_i), la soluble (S_i) y la asociada a células (C_i), variables que permitieron calcular tres parámetros:

$$\% \text{ disociación a } t_i = \frac{P_i}{P_i + S_i + C_i} \times 100$$

$$\% \text{ degradación a } t_i = \frac{S_i}{P_i + S_i + C_i} \times 100$$

$$\% \text{ unido a células a } t_i = \frac{C_i}{P_i + S_i + C_i} \times 100$$

El % unido a células cuando $t_i = 0$ fue considerado como indicador de la unión total a 4°C de cada proteína a las células mesangiales, corrigiendo sobre este dato los factores de unión inespecífica y de fondo del experimento, de forma análoga a la indicada en el apartado anterior.

En algunos experimentos se determinaron los % de disociación, degradación y unión a células en presencia de EDTA 5 mM o de los fragmentos Fc y F(ab) de la IgA, calculando después los porcentajes de inhibición correspondientes a cada parámetro.

3.4.- AISLAMIENTO DE LOS RECEPTORES DE IgA DE CELULAS MESANGIALES

3.4.1.- Obtención de membranas celulares marcadas:

Las células mesangiales de rata se crecieron hasta confluencia en frascos de 75 cm² de superficie y se marcaron con ¹²⁵I directamente en ellos [92]. Previamente se lavaron 3 veces con PBS frío y se pretrataron con el inhibidor de proteasas fenilmetilsulfonil fluoruro

5 μ M (PMSF) durante 10 minutos a 4°C con el fin de impedir la degradación de proteínas. El marcaje de las células mesangiales se realizó por adición de 10 ml de PBS que contenían 0.2 μ g de sulfosuccinimidil-3-(4-hidroxifenil) propionato (reactivo con el que se marcan la proteínas en los grupos amino primarios de los residuos de Asn y Gln), 1mCi de Na¹²⁵I, 10 μ g de cloramina T y 24 μ g de metabisulfito. Las células se incubaron sobre hielo durante 30 minutos y luego se lavaron 5 veces con 10 ml de PBS conteniendo KI 5mM. Después se despegaron las células por tratamiento con EDTA 2.5 mM en tampón Dulbecco y se centrifugaron a 600g durante 10 min.

Se preparó una solución de lisis por adición al tampón PBS de Nonidet P-40 al 1% (detergente no iónico), EDTA 1mM, iodoacetamida 10mM, PMSF 1mM y 1 μ g/ml de los inhibidores de proteasas antipaína, quimostatina, leupeptina y pepstatina A. El precipitado final de células marcadas se resuspendió en 0.5 ml de esta solución de lisis y se incubó durante 60 minutos a 4°C. El material insoluble se eliminó por centrifugación a 11600g durante 30 minutos y los sobrenadantes se guardaron a -20°C.

En todos los experimentos se utilizó la línea mielomonocítica U937 (ATCC; CRL 1593) como control de la expresión de los receptores de IgA, pues en este tipo de células ha sido muy bien caracterizado dicho receptor [54, 55].

3.4.2. Aislamiento de los receptores de IgA:

Los receptores de IgA se aislaron de los extractos celulares marcados mediante cromatografía de afinidad con Sepharosa-IgA. El lisado celular (0.5 ml) se prepurificó inicialmente por incubación con 200 μ l de Sepharosa-BSA durante 2 horas a 4°C, con rotación constante. Después de centrifugar a 11000g se desechó el precipitado y el sobrenadante se trató de forma idéntica con Sepharosa-IgG, para eliminar los receptores de IgG. El sobrenadante obtenido de esta segunda prepurificación se incubó con 200 μ l de Sepharosa-IgA, durante 18 horas a 4°C. Las proteínas no unidas se eliminaron mediante cinco lavados sucesivos de la Sepharosa-IgA con solución de lisis recién preparada. La fracción precipitada se resuspendió en tampón de muestras de electroforesis y se sometió a análisis electroforético utilizando un gel de desarrollo del 10% de acrilamida.

En algunos experimentos la mezcla de incubación (lisado celular + Sepharosa-IgA) se transfirió a una pequeña columna y se lavó con tampón de lisis. Las proteínas celulares retenidas en la columna se eluyeron por adición consecutiva de volúmenes de 1 ml de ácido acético 0.5 M con 1 % de Nonidet P-40. Cada fracción eluída se neutralizó con tampón Tris-HCl 2 M conteniendo 1 % de Nonidet P-40, a pH 8.7, y fue analizada por SDS-PAGE.

Los geles se tiñeron con plata por el método de las diaminas, se secaron a vacío en un secageles (BioRad) y se autorradiografiaron utilizando películas de rayos X y pantallas de intensificación del tipo X-Omat S (Eastman Kodak, Madrid) a -70°C . El análisis densitométrico de las películas se realizó en un Personal Densitometer (Molecular Dynamics, CA, USA).

3.5 AISLAMIENTO DE RNA Y TECNICAS DE HIBRIDACION

3.5.1.- Preparación de las sondas y marcaje:

Para estudiar la expresión del mRNA del receptor de IgA se empleó el plásmido pHuFc α R, construido por Maliszewski [55]. En la secuencia de bases de este plásmido está contenida la región que codifica el receptor para IgA descrito en células U937. Los demás plásmidos utilizados fueron suministrados por la ATCC: receptor Fc γ RIIa (63088), TNF α (53165), IL-6 (68636).

El DNA plasmídico se preparó siguiendo el protocolo de "miniprep" [191]. Las bacterias correspondientes a cada tipo de plásmido se crecieron durante 16 horas en 5 ml de medio de crecimiento de bacterias de Luria-Bertani, en presencia de 100 $\mu\text{l/ml}$ de ampicilina. Esta solución se transfirió luego en alícuotas de 1.5 ml a tubos eppendorf, microfugando para eliminar el sobrenadante. El precipitado celular se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos en 100 μl de solución I de miniprep. Las bacterias se lisaron con 200 μl de solución II durante 5 minutos en hielo. La adición posterior de una solución de acetato 5 M permitió la renaturalización del DNA plasmídico, permaneciendo precipitado

el DNA cromosómico, de mayor tamaño, que se eliminó por centrifugación. El DNA del sobrenadante se trató con 5 unidades de RNasa libre de DNasas durante 30 minutos a 37°C y luego se purificó mediante extracciones sucesivas con volúmenes iguales de las mezclas fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y cloroformo/isoamílico (24:1) y se precipitó en 2.5 volúmenes de etanol absoluto en presencia de 0.1 volumen de acetato sódico 3 M a pH 5.2.

La medida de la absorbancia a 260 nm permitió la cuantificación del DNA, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia equivale a 50 µg/ml de DNA bicatenario. La relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm da una idea aproximada de la pureza de la muestra (debe ser cercana a 2).

Para realizar el marcaje de las sondas se utilizó un método comercial de "nick translation". Aproximadamente 1 µg de DNA se marcó con 5 µl de ³²P-dCTP (actividad específica: 3000 Ci/mmol). La sonda marcada se separó de la radiactividad libre pasando la muestra a través de una columna preempaquetada de Sephadex G-50. La actividad específica de las sondas fue de aproximadamente 10⁸ cpm/µg.

3.5.2.- Extracción de RNA y cuantificación:

El RNA total celular se obtuvo utilizando la técnica del isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo en medio ácido [192]. Las células se lisaron por tratamiento con 0.8 ml de solución de lisis de RNA (ver sección de *Tampones y Soluciones*). Después se añadieron, secuencialmente, 0.8 ml de fenol (equilibrado en tampón Tris 10mM/EDTA 1 mM pH 7.6), 80 µl de acetato sódico 2 M a pH 4.0 y 160 µl de una mezcla cloroformo/isoamílico (relación 49:1). Con esta extracción se consiguió eliminar el DNA y las proteínas de la fracción celular inicial, quedándonos con el RNA contenido en la fase superior acuosa. El RNA se precipitó a -20°C con isopropanol durante un mínimo de una hora. El precipitado resultante se resuspendió en 0.3 ml de solución de lisis de RNA, se volvió a precipitar a -20°C con un volumen equivalente de isopropanol, se lavó con etanol al 70% y, una vez seco, se resuspendió en H₂O tratada con dietil pirocarbonato.

La cuantificación del RNA se realizó por medida de su absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta como factor de conversión que 1 unidad de absorbancia corresponde a

40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA. Si la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm era cercana a 2 indicaba ausencia de contaminación proteica en las muestras.

3.5.3.- Northern blot:

El RNA purificado se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Aproximadamente unos 30 μg de RNA de cada muestra se resuspendieron en tampón desnaturalizante en un volumen máximo de 60 μl , se calentaron durante 15 minutos a 55°C, enfriando rápidamente en hielo (para evitar su renaturalización). Se añadieron entonces 3 μl de tampón de electroforesis a las muestras y se aplicaron en los pocillos de un gel de agarosa al 1%, conteniendo un 6% de formaldehído y 1x MOPS.

El análisis electroforético se llevó a cabo en una cubeta horizontal (BioRad), con tampón de desarrollo (ver sección de *Tampones y Soluciones*) y empleando un voltaje constante de 80 voltios durante 5 horas aproximadamente. Transcurrida la electroforesis, la calidad del RNA se analizó en un transiluminador de luz ultravioleta, que permitió observar el bromuro de etidio unido a las bandas de RNA (preferentemente a los RNA ribosómicos, que son los más abundantes).

Se procedió entonces a la transferencia del RNA desde el gel de agarosa a una membrana de nylon, por capilaridad, en tampón fosfatos 0.025 M. El RNA transferido se fijó a las membranas mediante exposición durante 3 minutos a la luz ultravioleta producida por una lámpara de 245 nm y posterior calentamiento a 80°C durante 90 minutos.

3.5.4.- Prehibridación e hibridación:

Las membranas se prehibridaron durante 6-8 horas a 42°C en tampón fosfatos 50 mM a pH 6.5, conteniendo un 50% de formamida desionizada, 1% de SDS, 5x de SSC, 1x de solución de Denhardt y 0.1 mg/ml de DNA esperma de arenque desnaturalizado. La hibridación se realizó en una solución igual a la de prehibridación, a la que se añadió un 20% de sulfato de dextrano y 7×10^6 cpm de la sonda desnaturalizada. Después de 24 horas

de incubación 42°C, el exceso de sonda radiactiva se eliminó de las membranas mediante repetidos lavados con una solución de 0.1 % de SDS y 2x de SSC (45 minutos a temperatura ambiente y dos veces durante 30 minutos a 55°C, con agitación).

Una vez hibridadas, las membranas se expusieron a películas y pantallas de intensificación del tipo X-Omat S, durante 3-6 días a -70°C. Después de lavar las membranas para retirar la sonda marcada unida (3 minutos en H₂O a 95°C), se rehibridaron con la sonda del RNA ribosomal 28S, para asegurar que se había cargado la misma cantidad de RNA en cada pocillo. Las autorradiografías se cuantificaron por densitometrado, expresando los resultados en unidades densitométricas arbitrarias referidas a la expresión del RNA ribosómico 28S.

3.6.- MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE CALCIO INTRACELULAR

Para medir los cambios en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) se utilizaron células mesangiales de rata o humanas confluentes adheridas a cubres redondos de cristal en placas de 24 pocillos, cultivadas en RPMI-HEPES con 20% STF. El día anterior al experimento se disminuyó la concentración de STF hasta 0.5%.

La medida de $[Ca^{2+}]_i$ se realizó utilizando como sonda fluorescente el fura-2/AM, según el método descrito por Menè y col. [193], con las modificaciones de López-Farré y col. [194]. Las células en los cubres se lavaron con RPMI-HEPES sin STF y se incubaron durante 60 minutos a 37°C con fura-2 4 μ M en el mismo medio. Después se dejaron a 37°C durante 30 min en medio sin fura-2, para permitir la ruptura intracelular de la sonda fluorescente. Cada cubre de cristal se lavó dos veces con tampón KHH y se introdujo en una cubeta de cuarzo con 1 ml de KHH.

Los cambios de fluorescencia de las células mesangiales estimuladas con IgA o IgG se midieron a 37°C en un espectrofluorímetro LS50 (Perkin Elmer), que permitía la detección simultánea a dos longitudes de onda de excitación (340 y 380 nm), con una emisión fija a 500 nm. La lectura de la intensidad de fluorescencia (F) se integró a intervalos de 10 ms y se calculó por la relación entre la fluorescencia a 340 y 380nm.

En cada experimento se determinaron también la intensidad de fluorescencia máxima (F_{\max}) y la mínima (F_{\min}). La F_{\max} fue la fluorescencia correspondiente al fluoróforo saturado de Ca^{2+} , y se consiguió lisando las células por adición de Triton X-100 al 0.1 % , quedando así expuesto el fura-2 al calcio externo. El cálculo de la fluorescencia correspondiente al fluoróforo libre, F_{\min} , se consiguió añadiendo al medio de las células el quelante de Ca^{2+} ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), a una concentración final de 10 mM.

Con los datos obtenidos en cada experimento se calculó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, utilizando la ecuación de Grynkiewicz [195]:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}$$

donde F , F_{\max} y F_{\min} ya se han definido y K_d es la constante de disociación del fura-2 cuyo valor para la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es de 224 nM [194, 195].

En algunos experimentos las medidas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se realizaron en ausencia de calcio extracelular, añadiendo al medio 5 mM de EGTA y 2 mM de Tris antes de la adición de los estímulos. En otros casos las células mesangiales se preincubaron durante 10 minutos a 37°C en presencia de toxina de pertussis (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5×10^{-5} M de 8-(N,N-dietilamino)octil 3,4,5-trimetoxibenzoato (TMB-8) o 5×10^{-5} M de estaurosporina, antes de seguir la variación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

3.7.- DETERMINACION Y CARACTERIZACION DE CITOCINAS

3.7.1.- Estimulación de las células mesangiales para la producción de citocinas:

Se utilizaron células mesangiales de rata y humanas subconfluentes en placas de 6 pocillos, incubadas 24 horas antes de su utilización en medio RPMI-HEPES con 0.5% de STF. Los ensayos para producción de citocinas se realizaron en 1 ml del mismo medio, incubando las células mesangiales en presencia de diferentes concentraciones de los estímulos (IgA, IgG y desIgA, en forma monomérica o agregada) a 37°C en un incubador con 5% de CO₂. En algunos casos las incubaciones se llevaron a cabo en presencia de polimixina B o cicloheximida (CHX), inhibidores de la endotoxina y de la síntesis de proteínas, respectivamente.

Finalizados los tiempos de incubación (desde 3 a 48 horas) se recogieron los sobrenadantes libres de células y se almacenaron a -70°C hasta el análisis de la actividad de TNF α o IL-6 que contenían. Las células mesangiales se lavaron dos veces con PBS y se despegaron por tratamiento con NaOH 0.1N. La cantidad total de proteínas en cada pocillo se determinó mediante ensayo de Lowry [196].

3.7.2.- Determinación de TNF α :

La presencia de TNF α activo en los sobrenadantes se determinó mediante un bioensayo basado en la capacidad del TNF α de inducir la lisis de la línea celular de fibroblastos L929 [197]. Las células L929 se crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con glutamina 2mM, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina (RPMI completo) conteniendo 5% de STF y, cuando llegaron a confluencia, se tripsinizaron y se volvieron a sembrar con una relación 1:10. En los ensayos de determinación de la actividad citotóxica del TNF α se utilizaron células entre los pases segundo y cuarto.

En el día del experimento, las células L929 se tripsinizaron y se sembraron sobre una placa de 96 pocillos de fondo plano con una densidad de 3 x 10⁴ células por pocillo

(en 100 μ l de RPMI completo con 5 % de STF). Después de 4-6 horas de incubación a 37°C en estufa humidificada, con 5 % de CO₂ las células estaban adheridas a las placas formando una monocapa, con lo que podían ser utilizadas en el ensayo de citotoxicidad. Se añadieron 100 μ l de cada sobrenadante de células mesangiales, por duplicado y en diluciones seriadas, en presencia de una concentración final de 1 μ g/ml de actinomicina D (inhibidor de la síntesis de RNA).

Después de 14-16 horas a 37°C, las placas se lavaron y se procedió al fijado de las células vivas mediante incubación con formaldehído al 5 % en PBS durante 10 minutos. Se eliminó el exceso de formaldehído y se tiñeron las células durante 5 minutos con una solución de violeta cristal al 0.5 % en metanol al 20 %, lavando el exceso de colorante con agua. Una vez secas la placas se añadieron 100 μ l de ácido acético al 33 % a cada pocillo para solubilizar el colorante y se determinó la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro de microplacas Titertek Multiscan (Flow).

El porcentaje de citotoxicidad (CTX) para cada muestra se calculó según la fórmula

$$\% \text{ CTX} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

donde a es la absorbancia media de los pocillos control y b la de los pocillos con muestra.

En cada ensayo se utilizó una curva construida con TNF α recombinante humano (6 x 10⁷ U/ml) con el fin de estandarizar los experimentos. Los resultados se expresan en unidades de TNF α respecto de la curva estándar, corregidos según la cantidad total de proteínas en cada pocillo de las células mesangiales, determinada por Lowry.

3.7.3.- Determinación de IL-6:

La bioactividad de la IL-6 contenida en los sobrenadantes de células mesangiales se determinó utilizando la línea celular de hibridoma murino B9, dependiente de IL-6 [198]. Las células B9 se crecieron en RPMI completo conteniendo además 5 x 10⁻⁵ M de β -mercaptoetanol, 5 % de STF y 0.1 % de sobrenadante rico en IL-6. Este sobrenadante fue

obtenido a partir de células mononucleares de sangre periférica humana, cultivadas a una concentración de 10^6 células/ml durante 24 horas en presencia de 1 ng/ml de LPS.

Para realizar el bioensayo, se lavaron las células B9 tres veces en medio de cultivo sin IL-6 y se mantuvieron en el mismo medio durante 14-16 horas. Después se sembraron sobre placas de 96 pocillos de fondo plano a una concentración de 5000 células por pocillo en 200 μ l y se incubaron durante 72 horas a 37°C en estufa humidificada, con 5% de CO₂. Aproximadamente 6 horas antes de finalizar la incubación, se añadió a cada pocillo 1 μ Ci de [³H-metil]timidina (actividad específica 81.3 Ci/mmol).

Las células se recogieron utilizando un lavador automático (Flow) y se determinó la radiactividad incorporada a las células con un contador β (Beckman). La bioactividad de cada muestra se analizó en diluciones 1/2 seriadas y se expresó en unidades de IL-6, en relación con los valores obtenidos en una curva estándar construida con IL-6 recombinante humana (1×10^8 U/mg). Estos valores en unidades se corrigieron después según la cantidad total de proteínas celulares determinada por Lowry [196].

3.7.4.- Especificidad de los ensayos de TNF α e IL-6:

En ambos ensayos, para asegurar que la bioactividad medida en los sobrenadantes era debida exclusivamente al TNF α o a la IL-6, según el caso, se realizaron estudios de neutralización con anticuerpos policlonales anti-TNF α (15000 unidades neutralizantes por mg de anticuerpo purificado) o anti-IL-6 (20 μ g de anticuerpo neutralizan 10 ng de IL-6 humana).

En el ensayo de TNF α , se incubaron 100 μ l de sobrenadantes de células mesangiales o de TNF α recombinante humano con 1 μ g de anticuerpo anti-TNF α durante 60 minutos a 37°C y luego se procedió a la medida de la actividad citolítica residual en el ensayo con las células L929 (figura 5a).

En el ensayo de IL-6, se añadió 1 μ g de anticuerpo anti-IL-6 directamente a los pocillos que contenían las muestras o la IL-6 recombinante humana. Al finalizar el ensayo se comparó la capacidad proliferativa de las células B9 en ausencia o presencia del anticuerpo anti-IL-6 (figura 5b).

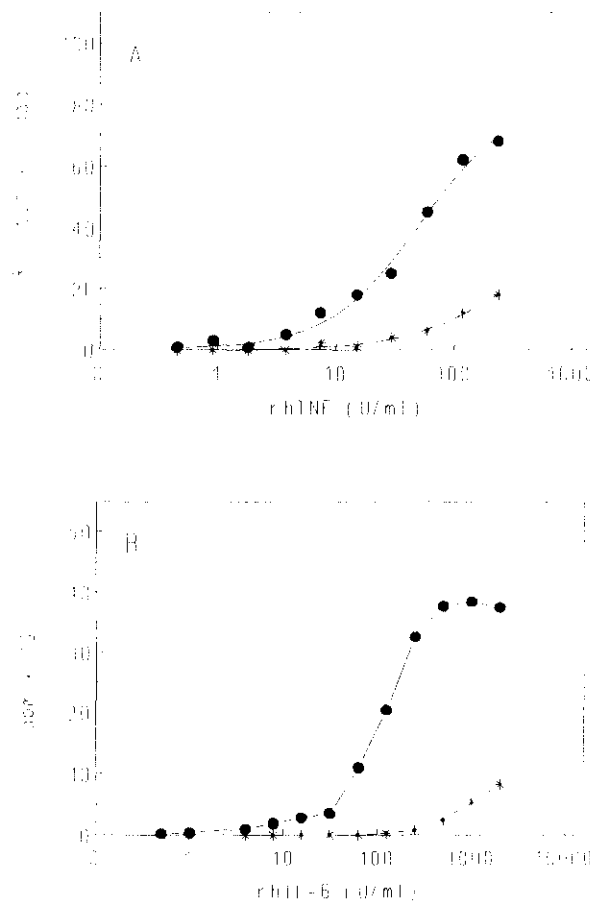


Figura 5: Curvas estándar de $TNF\alpha$ e IL-6 en el bioensayo con las células L929 y B9: Ambos bioensayos se realizaron con diferentes concentraciones de $TNF\alpha$ (A) o IL-6 (B) recombinantes humanas en ausencia (●) o en presencia (*) de 1 μg de anticuerpo policlonal anti- $TNF\alpha$ o anti-IL-6. Los resultados se expresan en porcentaje de citotoxicidad en las células L929, o como dpm incorporadas en las células B9 (después de haber restado el basal).

3.8.- ENSAYOS DE PROLIFERACION DE CELULAS MESANGIALES

3.8.1.- Medida de la incorporación de [3H]timidina:

Las células mesangiales de rata y humanas se subcultivaron en placas de 96 pocillos de fondo plano, a una densidad aproximada de 5×10^3 células/pocillo y 3×10^3 células/pocillo, respectivamente. Antes de realizar los experimentos de proliferación, las células mesangiales

se mantuvieron durante tres días en RPMI completo con 0.5% de STF, con el fin de dejarlas en estado quiescente. Se añadieron entonces 200 μ l de medio de cultivo nuevo con 0.5% de STF, conteniendo diferentes concentraciones de IgA o IgG (agregadas o en forma monomérica) por triplicado y se realizó una incubación de 24 horas a 37°C en atmósfera humidificada, con 5% de CO₂. Aproximadamente 4 horas antes de finalizar el ensayo, se añadió 1 μ Ci de [³H-metil]timidina a cada pocillo.

Finalizado el tiempo de incubación, se lavaron las células tres veces con PBS, se despegaron de las placas por tratamiento con tripsina-EDTA durante una hora y se recogieron sobre filtros de papel con la ayuda de un lavador automático. La cuantificación en un contador β nos permitió determinar la radiactividad asociada al DNA celular. Los datos se expresan en dpm/pocillo o en porcentaje de incorporación de timidina respecto del control de células en ausencia de estímulo.

3.8.2.- Ensayo colorimétrico del azul de metileno:

El ensayo de incorporación de azul de metileno en las células vivas se utilizó como un método adicional de medida de la proliferación celular [199]. El experimento se realizó incubando las células mesangiales por triplicado con concentraciones crecientes de las proteínas durante 48 horas a 37°C, en RPMI completo conteniendo 0.5% de STF. Al cabo de este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con 10% de formol en PBS durante un tiempo mínimo de 60 minutos. Después de dos lavados con PBS, las células vivas se tiñeron durante 30 minutos con azul de metileno al 1%. El exceso de colorante se eliminó mediante sucesivos lavados de la placa de 96 pocillos en tampón borato 0.01M. Una vez seca la placa, se eluyó el colorante de las células con 100 μ l de etanol en HCl 0.1N (relación 1:1) y se leyó la absorbancia de los pocillos a 620 nm mediante un espectrofotómetro de microplacas. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto a la absorbancia de células en ausencia de estímulo.

Como control de los experimentos de proliferación se empleó una curva con concentraciones crecientes de STF (desde 0.5 a 20%) en presencia o en ausencia del inhibidor de la síntesis de RNA actinomicina D.

3.9.- ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos en los experimentos se expresan en las unidades correspondientes, como la media \pm error estándar (EE), o en porcentajes respecto del control, como la media \pm desviación estándar (DE). Para el análisis de la significación, las poblaciones se compararon utilizando el test no pareado de Wilcoxon, considerando que una medida es significativa cuando el valor de p obtenido es inferior a 0.05.

IV.- RESULTADOS

1.- CARACTERIZACION DE LA UNION DE IgA A LAS CELULAS MESANGIALES:

1.1.- ESTUDIOS DE UNION:

Varios investigadores han demostrado que en las células mesangiales existen receptores para la región constante Fc de la IgG [92-99], utilizando experimentos de unión de proteínas marcadas con ^{125}I y de captación de partículas de oro coloidal recubiertas de IgG. Sin embargo, no se ha descrito hasta el momento la existencia de receptores para IgA en células mesangiales. En este apartado describimos los procesos de unión de la ^{125}I -IgA a las células mesangiales en cultivo, realizando además estudios comparativos con otras inmunoglobulinas o con diferentes tipos de células.

1.1.1.- Unión de la IgA a las células mesangiales

1.1.1.a.- Cinética de la unión de la IgA:

En los primeros experimentos se seleccionó la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ de IgA marcada radiactivamente y se siguió su cinética de unión a las células mesangiales de rata en cultivo, desde 5 a 240 minutos. Todos los estudios de unión se llevaron a cabo en tampón PBS-BSA a una temperatura de 4°C, para evitar la internalización del ligando [200].

Como puede observarse en la figura 6, la unión de la IgA a las células se asemeja a una reacción de segundo orden de tipo reversible. La unión es progresiva desde el inicio hasta aproximadamente unos 60 minutos de incubación; a partir de este tiempo el incremento de la proteína unida se va estabilizando, hasta llegar a la saturación.

En esta figura también se observa que ambas formas moleculares de la IgA (monomérica y polimérica) presentan una misma cinética de unión, si bien, para una misma dosis de proteína radiactiva, la cantidad de IgA polimérica unida supera en un 50%

aproximadamente a la cantidad de IgA monomérica unida.

A la vista de estos resultados seleccionamos el tiempo de 60 minutos para realizar los estudios de unión. En la mayor parte de ellos se utilizó como ligando la IgA monomérica.

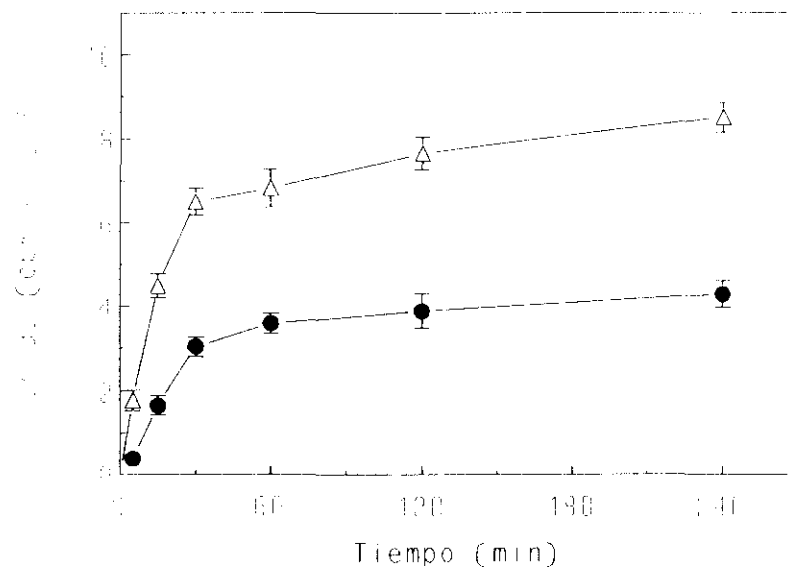


Figura 6: Cinética de la unión de la IgA a las células mesangiales de rata: Las células se incubaron en 1 ml de PBS-BSA con 1 $\mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -IgA monomérica (●) o ^{125}I -IgA polimérica (Δ) durante 5-240 minutos a 4°C. A los tiempos indicados se retiró el medio y las células se lavaron con PBS frío y se despegaron con NaOH 1N. Los resultados se expresan en cpm unidas a las células a los distintos tiempos y son la media \pm EE de 2 experimentos realizados por duplicado.

1.1.1.b.- Constante de afinidad y número de sitios para IgA:

Las células mesangiales de rata, cultivadas hasta confluencia en frascos de cultivo de 25cm², se incubaron en tampón PBS-BSA con diferentes concentraciones de IgA monomérica radiactiva (desde 0.039 hasta 5 $\mu\text{g/ml}$), durante 60 minutos a 4°C. La medida de la radiactividad retenida en las células nos permitió calcular la concentración de IgA unida. En cada punto se determinó la unión inespecífica (en presencia de un exceso de 100

veces para cada concentración de proteína marcada) y el fondo (unión al plástico en ausencia de células). Estas dos cantidades se restaron a la radiactividad total unida a las células, calculando así la unión específica.

Como se muestra en la figura 7, la unión específica de la IgA a las células mesangiales es dependiente de la dosis. Los puntos se ajustan perfectamente a una curva hiperbólica (coeficiente de regresión de 0.998). La cantidad de ligando unido aumenta rápidamente con la concentración añadida, hasta llegar a aproximadamente $1.5 \mu\text{g/ml}$, punto en que se satura la curva de unión de ^{125}I -IgA.

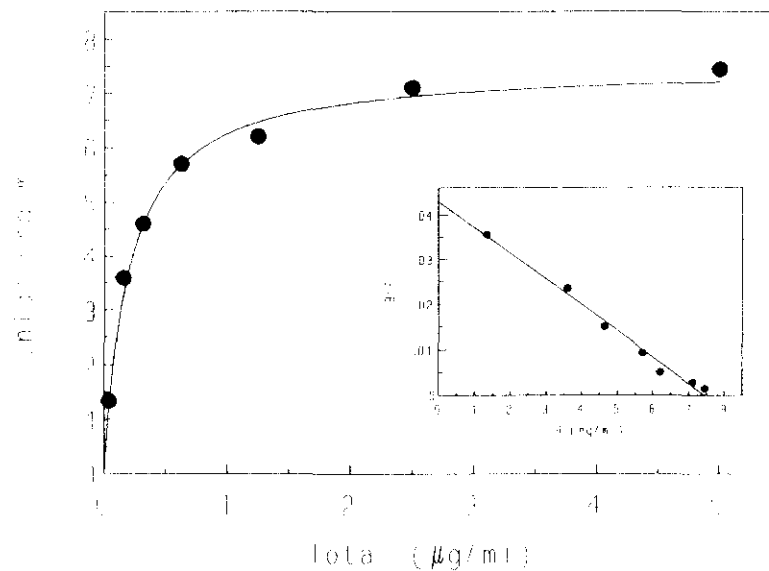


Figura 7: Unión de IgA a las células mesangiales de rata: Las células se incubaron durante 60 minutos a 4°C en PBS-BSA con varias concentraciones de ^{125}I -IgA (0.039 - $5 \mu\text{g/ml}$). La unión específica (ng/ml) se calculó teniendo en cuenta para cada punto la unión inespecífica y el fondo. En el recuadro interior se muestra el análisis de Scatchard de dicha unión. Experimento representativo de un total de 5 realizados por duplicado.

El análisis de Scatchard de la unión específica se representa en la parte interior de la figura 7. La representación de los datos de ligando unido/ligando libre (B/F) frente a la concentración de ligando unido (B) se ajusta a una línea recta, lo que indica la existencia de un solo tipo de sitios de unión. La pendiente de la recta y el punto de corte con las abscisas nos permiten calcular la constante de afinidad (K_a) de la unión de IgA a las células mesangiales y el número de sitios de unión (n), respectivamente.

Los resultados obtenidos a partir de cinco experimentos diferentes nos llevan a la conclusión de que en las células mesangiales existe una población homogénea de sitios de unión de alta afinidad, con una constante K_a de $(7.8 \pm 1) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ y un número aproximado de $(1.0 \pm 0.2) \times 10^5$ moléculas de IgA unidas por célula (media \pm EE).

1.1.1.c.- Especificidad de la unión de la IgA a las células mesangiales:

Para determinar la especificidad de la unión de IgA a las células mesangiales de rata se realizaron estudios de inhibición o desplazamiento de la unión. En estos experimentos, las células mesangiales se preincubaron durante 45 minutos a 4°C con diferentes concentraciones de proteínas no marcadas antes de añadir una concentración fija de ^{125}I -IgA.

La figura 8 representa la curva de desplazamiento de la unión de IgA a las células mesangiales. Se aprecia un descenso rápido del porcentaje de unión de ^{125}I -IgA ($5 \mu\text{g/ml}$) según aumenta la concentración de IgA no marcada presente en el medio (desde 50 a 5000 $\mu\text{g/ml}$). El 50% del desplazamiento de la unión de IgA marcada se alcanza aproximadamente con un exceso de 60 veces de proteína sin marcar.

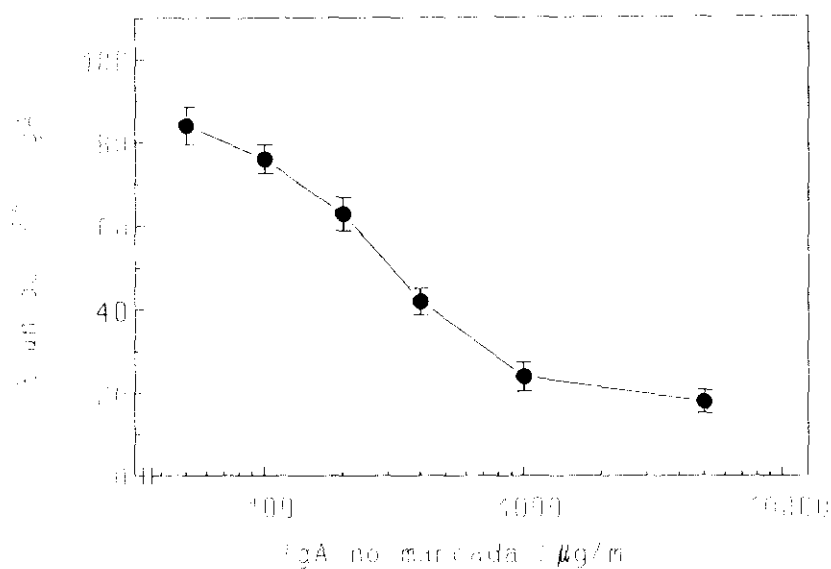


Figura 8: Desplazamiento de la unión de IgA a las células mesangiales de rata: Las células se incubaron durante 45 minutos a 4°C con varias concentraciones de IgA no marcada y después durante 60 minutos con 5 µg/ml de ^{125}I -IgA. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del total unido en ausencia de IgA no marcada y son la media \pm DE de 3 experimentos realizados por duplicado.

En otros experimentos se intentó determinar la especificidad de tipo de la unión de la IgA a las células mesangiales, por lo que se realizaron ensayos de inhibición con otras inmunoglobulinas. Como se muestra en la figura 9, la presencia de IgG o IgM en el medio no reduce de forma considerable la unión de ^{125}I -IgA (1 µg/ml) a las células mesangiales. Los porcentajes de inhibición obtenidos con ambas inmunoglobulinas no superan en ningún caso el 15%, mientras que la misma cantidad de IgA inhibe hasta un 73%. Estos resultados indican que las células mesangiales son capaces de unir IgA a través de un receptor específico para esta clase de inmunoglobulina.

Los experimentos de inhibición se realizaron también en presencia de los fragmentos Fc y F(ab) de la IgA, obtenidos por digestión con la proteasa de IgA1. En la figura 9 se muestra que los mayores porcentajes de inhibición se consiguen con el fragmento Fc, mientras que con el F(ab) no se alcanzan inhibiciones superiores al 16%. Estos datos

sugieren que la interacción entre la IgA y las células mesangiales se produce específicamente a través de la región constante de la inmunoglobulina.

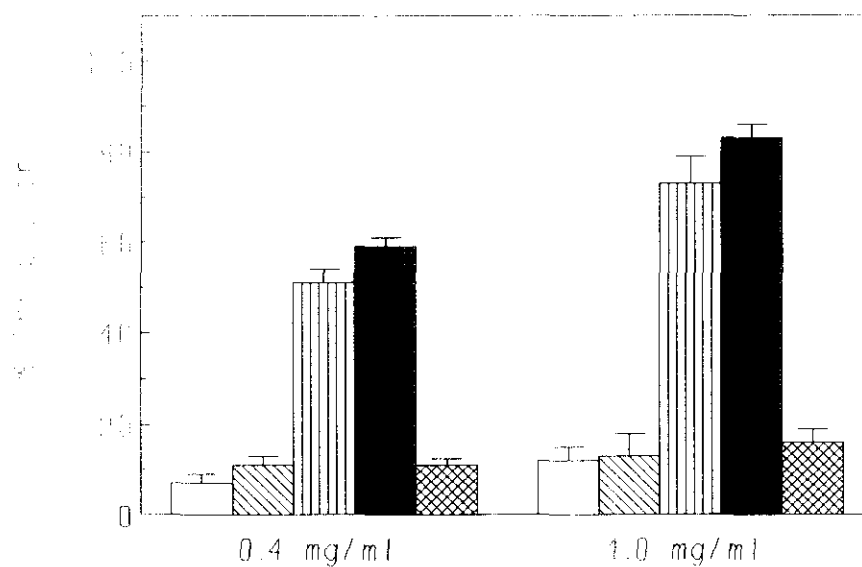


Figura 9: Especificidad de la unión de la IgA a las células mesangiales de rata: Se realizó una preincubación con diversas concentraciones de proteínas no marcadas, antes de añadir 1 μ g/ml de 125 I-IgA. Los símbolos indican: \square , IgG humana; diagonal lines , IgM humana; vertical lines , IgA; \blacksquare , fragmento Fc; cross-hatch , fragmento F(ab) de la IgA. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición respecto de la unión total de la 125 I-IgA en ausencia de inhibidores y son la media \pm DE de 8 experimentos diferentes.

1.1.1.d.- Unión de la IgA a otros tipos de células:

Todos los ensayos de unión descritos hasta el momento se han realizado en un sistema heterólogo, es decir, empleando IgA monomérica humana y células mesangiales de rata. En otros sistemas descritos está demostrado que las inmunoglobulinas de distinta especie (por ejemplo, de rata y humana) se unen con una afinidad similar a los receptores Fc presentes en monocitos humanos [201], o al contrario, inmunoglobulinas humanas interaccionan de forma similar con monocitos humanos y macrófagos de ratón [32, 202].

En nuestro caso, hemos realizado algunos experimentos de unión en un sistema homólogo, determinando la unión de la IgA monomérica humana a las células mesangiales de origen humano. Los experimentos se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos, incubando las células (1×10^5 /pocillo) durante 60 minutos a 4°C con $1 \mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -IgA en tampón PBS-BSA. Como se muestra en la figura 10, la IgA humana es capaz de unirse a su receptor, tanto en un sistema heterólogo (células mesangiales de rata) como en un sistema homólogo (células mesangiales humanas).

La cinética de la unión es similar en ambas células y se puede inhibir hasta un 70% en presencia de un exceso de IgA no marcada, lo que demuestra la especificidad de la unión. Estos resultados indican que los receptores para IgA presentes en las células mesangiales de rata y humanas, o son idénticos, o están estrechamente relacionados en cuanto a su estructura y capacidad de unión de la IgA.

Utilizamos como control en los experimentos de unión dos tipos celulares diferentes de las células mesangiales. Los fibroblastos renales de la línea celular NRK49F sirvieron como control negativo, ya que no poseen receptores de inmunoglobulinas. La unión de IgA a estas células es muy pequeña y apenas desplazable con un exceso de IgA no marcada, con lo que se puede considerar esta unión como inespecífica. La máxima unión determinada corresponde a los macrófagos peritoneales de rata, células utilizadas como control positivo de la unión, pues en ellas se han descrito receptores para IgA [32, 58].

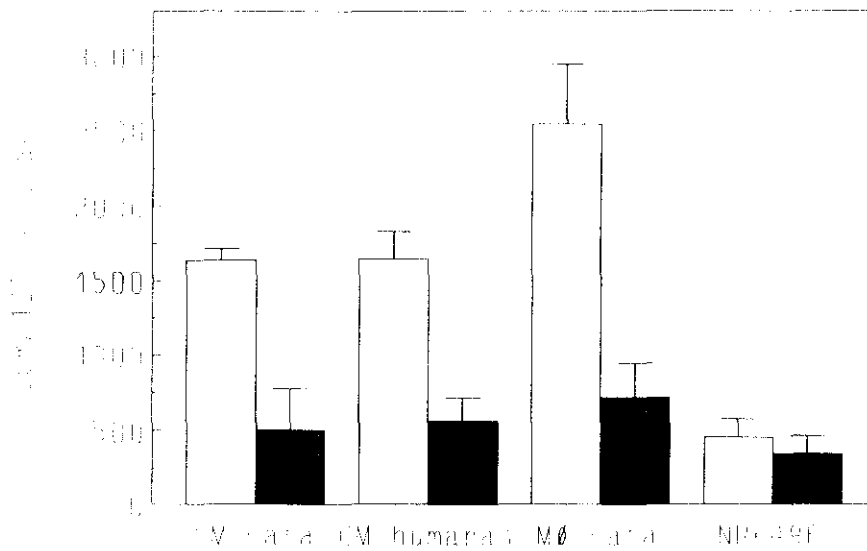


Figura 10: Unión de la IgA a distintos tipos celulares: Aproximadamente 10^5 células mesangiales (CM) de rata, humanas, macrófagos peritoneales de rata ($M\phi$) y fibroblastos renales de la línea NRK49F se incubaron durante 60 minutos a 4°C en PBS-BSA con $1\ \mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -IgA en ausencia (\square) o después de una preincubación de 45 minutos con $1\ \text{mg/ml}$ de IgA no marcada (\blacksquare). Los resultados se expresan en cpm unidas por célula y representan la media \pm EE de 4 experimentos diferentes.

En los macrófagos peritoneales de rata se llevó a cabo un estudio más detallado de la unión de IgA. En estos experimentos, los macrófagos se preincubaron durante 45 minutos a 4°C con diferentes concentraciones de IgA no marcada antes de añadir una concentración fija de ^{125}I -IgA ($5\ \mu\text{g/ml}$). Como se muestra en la figura 11, la unión de ^{125}I -IgA es totalmente desplazable. El porcentaje de unión descende según aumenta la concentración de inhibidor, consiguiéndose un 50% de inhibición con un exceso de 50 veces de IgA no marcada.

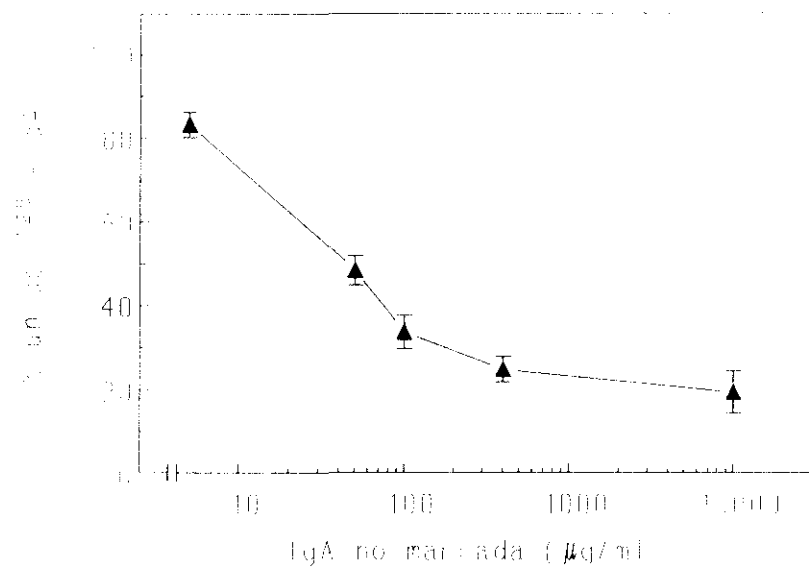


Figura 11: Unión de IgA a los macrófagos peritoneales de rata: Las células se incubaron durante 45 minutos a 4°C con varias concentraciones de IgA no marcada y después durante 60 minutos con 5 $\mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -IgA. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del total unido en ausencia de IgA no marcada y son la media \pm DE de 2 experimentos realizados por duplicado.

1.1.1.e.-Inhibiciones de la unión de IgA con carbohidratos:

Como ya se ha comentado en la *Introducción*, la IgA es una molécula con un alto grado de glicosilación. Los carbohidratos mayoritarios contenidos en su estructura son β -D-galactosa (Gal), β -D-N-acetil-galactosamina (GalNAc) y β -D-N-acetil-glucosamina (GlcNAc) [15-17]. En este apartado intentamos estudiar si estos tres carbohidratos influyen de alguna forma en la unión de IgA a células mesangiales de rata en cultivo. Para ello realizamos ensayos de inhibición, con una sola dosis de ^{125}I -IgA (1 $\mu\text{g/ml}$) y diferentes concentraciones de los oligosacáridos (desde 0.001 hasta 0.1 M).

Como se observa en la tabla I, la preincubación de las células mesangiales con los tres carbohidratos por separado produce un descenso apreciable de la cantidad de IgA unida. La inhibición de la unión de IgA es dependiente de la dosis de oligosacárido, obteniéndose los máximos con una concentración de 0.1 M. Los mayores porcentajes de inhibición se

observan con GalNAc (hasta un 38%). La adición simultánea de dos carbohidratos (a una concentración de 0.01 M) es más efectiva, alcanzándose una máxima inhibición (46%) con la combinación Gal + GalNAc.

Estos resultados nos permiten concluir que los carbohidratos contenidos en la estructura de la IgA juegan un papel importante en la unión de esta proteína a las células mesangiales de rata.

TABLA I
Inhibición de la unión de IgA con diferentes carbohidratos

Carbohidrato	0.001 M	0.01 M	0.1 M
Gal	13 \pm 2	30 \pm 3	35 \pm 2
GalNAc	25 \pm 4	38 \pm 4	40 \pm 5
GlcNAc	10 \pm 2	32 \pm 5	33 \pm 5
Gal + GalNAc	N.D.	46 \pm 5	N.D.
Gal + GlcNAc	N.D.	35 \pm 3	N.D.
GalNAc + GlcNAc	N.D.	40 \pm 7	N.D.

Las células mesangiales se preincubaron durante 45 minutos con varias concentraciones de carbohidratos antes de añadir 1 μ g/ml de 125 I-IgA. Los porcentajes de inhibición se calculan con respecto al control (proteína unida en ausencia de inhibidor) y aparecen expresados como media \pm DE de 4-13 experimentos diferentes, realizados por duplicado. En todos los casos el descenso respecto del basal fue significativo ($p < 0.05$).

1.1.2.- Unión de la IgA desializada a las células mesangiales:

A la vista de los resultados de inhibición obtenidos en presencia de azúcares, nos planteamos estudiar las características de la unión de la IgA parcialmente desializada (desIgA) a las células mesangiales de rata. La desialización consiste en el tratamiento de la proteína con neuraminidasa, eliminando así los residuos terminales de ácido siálico de las cadenas hidrocarbonadas [30]. En la molécula de IgA las cadenas glicosiladas que terminan en ácido siálico suelen tener como oligosacárido anterior GalNac o Gal [2]. De esta forma, es de suponer que en la estructura de la desIgA aparezcan más accesibles estos dos residuos hidrocarbonados.

1.1.2.a.- Constante de afinidad y número de sitios para desIgA:

Los experimentos de unión de ^{125}I -desIgA se realizaron de igual forma que los descritos para ^{125}I -IgA y los factores de unión inespecífica y fondo del experimento se tuvieron igualmente en cuenta.

En la figura 12 se muestra la unión específica de la desIgA a las células mesangiales de rata en cultivo. La cantidad de ligando unido aumenta gradualmente con la concentración de ligando añadido, alcanzándose la saturación de la isoterma de unión con aproximadamente 3 $\mu\text{g/ml}$ de proteína marcada.

Si se comparan las curvas de unión de IgA y desIgA, puede observarse que se necesita una mayor concentración de desIgA para alcanzar la saturación. En todos los puntos estudiados la cantidad de desIgA unida es mayor que la de IgA (figuras 7 y 12).

La gráfica de Scatchard de la unión de la ^{125}I -desIgA a las células mesangiales se muestra en la parte interior de la figura 12. Los puntos se ajustan con un buen coeficiente de regresión a una recta, lo que indica que existe posiblemente un solo tipo de sitios de unión para desIgA en las células mesangiales de rata.

A partir de cinco experimentos realizados, se obtuvo una K_a de $(2.6 \pm 0.5) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ y un número de sitios por célula mesangial de $(1.9 \pm 0.2) \times 10^5$ (media \pm EE). Estos dos parámetros están en el mismo rango que los calculados para la unión de IgA aunque, en términos absolutos, la afinidad es tres veces más pequeña y el número de sitios casi dos veces mayor.

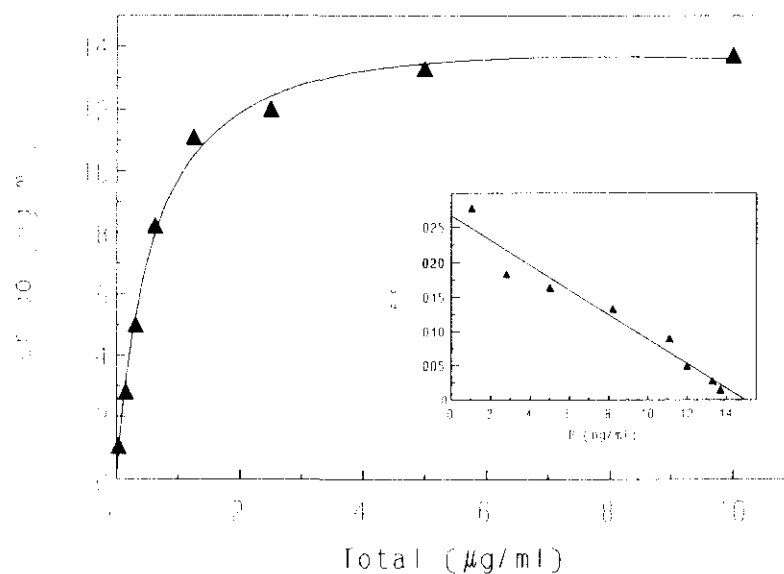


Figura 12: Unión de desIgA a las células mesangiales de rata en cultivo: Las células se incubaron durante 60 minutos a 4°C con diferentes concentraciones de ^{125}I -desIgA (desde 0.039 hasta 10 $\mu\text{g/ml}$). Los valores de la unión específica se expresan en ng/ml, teniendo en cuenta para cada punto la unión inespecífica y el fondo. En el recuadro interior de la gráfica se muestra el análisis de Scatchard de dicha unión. Experimento representativo de un total de 5, realizados por duplicado.

1.1.2.b.- Especificidad de la unión de desIgA a las células mesangiales:

Se realizaron en primer lugar ensayos de desplazamiento de la unión de ^{125}I -desIgA con diferentes concentraciones de desIgA no marcada. El inhibidor se preincubó durante 45 minutos y luego se siguió la unión de la desIgA marcada a 4°C y 60 minutos. Como se observa en la figura 13A, la curva de inhibición de la unión de ^{125}I -desIgA por desIgA no

marcada es de tipo sigmoide. El 50% de la cantidad de ^{125}I -desIgA unida al principio es desplazado cuando en el medio hay aproximadamente un exceso de 60 veces de desIgA no marcada.

Para determinar la especificidad de clase de la unión de desIgA a las células mesangiales se llevaron a cabo inhibiciones en presencia de diferentes inmunoglobulinas. La unión ^{125}I -desIgA en presencia de IgG o la IgM se inhibe solamente un 13%, mientras que una cantidad similar de desIgA no marcada es capaz de desplazar la unión casi totalmente (figura 13B).

Intentamos determinar con más detalle la naturaleza de la interacción entre la desIgA y las células mesangiales. Para ello se comparó el grado de unión de la desIgA en presencia de los fragmentos Fc y F(ab). Como se observa en la figura 13B, los mayores porcentajes de inhibición se obtienen con el fragmento Fc de la IgA (78%), mientras que el desplazamiento de la unión debido al fragmento F(ab) no supera en ningún caso el 20%.

Estos resultados ponen de manifiesto que la unión de la desIgA a las células mesangiales tiene lugar a través de un receptor específico para la región constante de la inmunoglobulina.

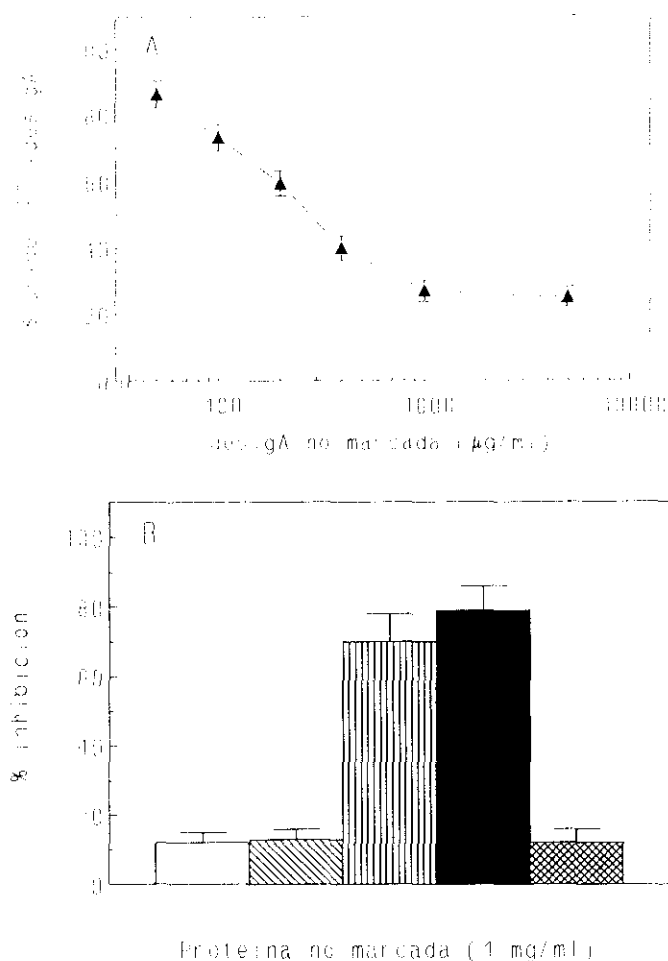


Figura 13: Especificidad de la unión de la desIgA a las células mesangiales: (A) Las células se preincubaron durante 45 minutos a 4°C con diferentes concentraciones de desIgA no marcada, antes de la adición de ^{125}I -desIgA ($5 \mu\text{g/ml}$). (B) La unión se realizó a 4°C y 60 minutos con $1 \mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -desIgA, habiendo realizado una incubación previa con las proteínas no marcadas. Los símbolos significan:

□, IgG; ▨, IgM; ▩, desIgA; ■, fragmento Fc de la IgA; ▤, fragmento F(ab) de la IgA.

Los resultados se expresan como porcentaje de unión (A) o de inhibición (B) respecto de la unión total de la ^{125}I -desIgA en ausencia de proteínas no marcadas. Media \pm DE de 3 experimentos realizados por duplicado.

1.1.2.c.- Inhibición de la unión de desIgA con carbohidratos:

Ya hemos demostrado que la presencia de carbohidratos solubles en el medio reduce la unión de la IgA a las células mesangiales. Es de suponer que lo mismo ocurra con la unión de la desIgA, que posee más carbohidratos expuestos susceptibles de unirse a las

células. Efectivamente, cuando las células mesangiales se preincubaban con los tres carbohidratos Gal, GalNAc y GlcNAc, por separado, se observa una inhibición de la unión de ^{125}I -desIgA dependiente de la dosis de carbohidrato empleada (tabla II). Los descensos de la unión de desIgA son más acusados cuando los experimentos se realizan con parejas de azúcares, sobre todo con Gal + GalNAc.

En general, los porcentajes de inhibición con azúcares de la unión de desIgA a las células mesangiales son superiores a los calculados para la unión de IgA. En ambos casos coincide que el carbohidrato con mayor capacidad inhibitoria es GalNAc pero, mientras que la unión de IgA es desplazada un 40% (tabla I), la inhibición de la unión de desIgA alcanza el 65% (tabla II).

El mismo hecho puede observarse cuando se utilizan combinaciones de dos carbohidratos. La unión de desIgA se desplaza hasta un 64% cuando en el medio están presentes simultáneamente Gal y GalNAc (tabla II); en las mismas condiciones, la inhibición detectada en la unión de la IgA es menor (46%; tabla I).

TABLA II
Inhibición de la unión de desIgA con diferentes carbohidratos

Carbohidrato	0.001 M	0.01 M	0.1 M
Gal	19 \pm 2	51 \pm 2	64 \pm 2
GalNAc	23 \pm 3	55 \pm 4	65 \pm 5
GlcNAc	10 \pm 3	36 \pm 4	49 \pm 3
Gal + GalNAc	N.D.	64 \pm 3	N.D.
Gal + GlcNAc	N.D.	54 \pm 10	N.D.
GalNAc + GlcNAc	N.D.	54 \pm 6	N.D.

Las células mesangiales se preincubaron con varias concentraciones de carbohidratos antes de añadir 1 $\mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -desIgA. Los porcentajes de inhibición se calculan con respecto al control (proteína unida en ausencia de inhibidor) y se expresan como la media \pm DE de un total de 4-13 experimentos realizados por duplicado. La significación respecto del control fue de $p < 0.05$.

Estos resultados demuestran que los carbohidratos contenidos en la estructura molecular de la IgA participan en la unión a las células mesangiales. La participación parece cobrar más importancia cuando el ligando utilizado es la desIgA, que presenta más residuos azucarados accesibles (sobre todo Gal y GalNAc). Es muy probable que la parte hidrocarbonada de la molécula actúe como modulador en la interacción con las células mesangiales, ya sea de forma directa (unión al receptor celular) o indirecta (interviniendo en la disposición espacial de los residuos implicados en la unión).

1.1.3.- Unión de asialoorosomucoide a las células mesangiales

En las páginas previas hemos determinado que, tanto la IgA como la desIgA, se unen a las células mesangiales a través de un receptor específico para la región Fc de la inmunoglobulina. Sin embargo, los oligosacáridos de la estructura proteica tienen un cierto protagonismo, ya que las inhibiciones obtenidas con Gal y GalNAc son bastante considerables. En este punto se plantearían dos posibilidades. La primera sería que las células mesangiales poseen un receptor del tipo Fc para la IgA, en cuya unión participa no sólo la estructura proteica de la molécula, sino los residuos hidrocarbonados que contiene, sobre todo los de la región bisagra. La segunda posibilidad es que exista en las células mesangiales un segundo tipo de receptor que sea capaz de unir IgA y desIgA a través de sus oligosacáridos, sobre todo Gal y GalNAc.

Los experimentos que se detallan en este apartado van encaminados a confirmar o descartar la segunda posibilidad mencionada. Para ello se realizaron estudios de unión con orosomucoide (α_1 -glicoproteína), proteína no relacionada con el grupo de las inmunoglobulinas que posee cuatro ramas de oligosacáridos con ácido siálico en cada extremo terminal. La desialización del orosomucoide deja expuesto un residuo de Gal terminal en cada rama [27, 35].

1.1.3.a.- Constante de afinidad y número de sitios para ASOR:

Para determinar la capacidad de unión del asialoorosomucoide (ASOR) a las células mesangiales de rata, se hicieron experimentos análogos a los descritos para IgA y desIgA. Según los resultados que se muestran en la figura 14, la unión de ^{125}I -ASOR a las células mesangiales es dependiente de la dosis y saturable en el rango de concentraciones estudiado (de 0.009 a 0.2 μM).

En el recuadro interno de la figura 14 está representado el gráfico de Scatchard de la curva de unión media del ASOR a las células mesangiales. Los parámetros de la recta nos permiten calcular un valor de 1.3×10^6 sitios de unión por célula, con una constante de afinidad de $2.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

A la vista de estos resultados podríamos decir que en las células mesangiales existe un receptor capaz de unir glicoproteínas desializadas, cuya afinidad es menor que la del receptor descrito para IgA y desIgA, pero con una mayor población de sitios de unión por célula.

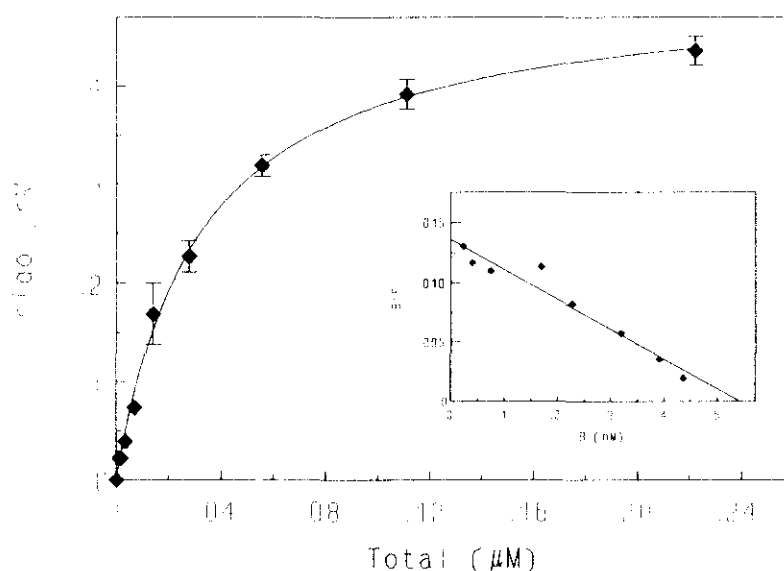


Figura 14: Unión de ^{125}I -ASOR a las células mesangiales de rata en cultivo: Las células se incubaron durante 60 minutos a 4°C con concentraciones molares crecientes de ASOR marcado. Los datos de unión específica se expresan en nM y son la media \pm EE de 4 experimentos realizados por duplicado. En el recuadro interior se representa el gráfico de Scatchard de la unión específica.

1.1.3.b.- Especificidad de la unión de ASOR a las células mesangiales:

La curva de autodesplazamiento de la unión del ASOR a las células mesangiales se muestra en la figura 15. Los puntos de la gráfica de inhibición se ajustan a una curva de tipo sigmoide. La capacidad de las células mesangiales de unir ^{125}I -ASOR disminuye de forma dependiente de la concentración de ASOR no marcado, alcanzándose un 50% de inhibición en presencia de un exceso de 80 veces de proteína.

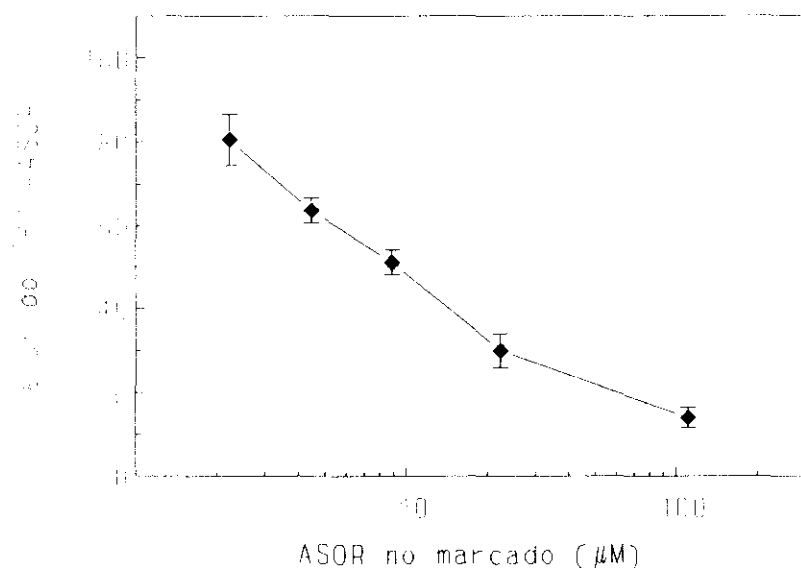


Figura 15: Desplazamiento de la unión de ^{125}I -ASOR a las células mesangiales de rata: Las células se incubaron a 4°C durante 60 minutos con $0.11\ \mu\text{M}$ de ^{125}I -ASOR, después de una incubación previa de 45 minutos en presencia de concentraciones crecientes de ASOR no marcado. Los resultados se expresan en porcentaje respecto de la unión total en ausencia de proteína sin marcar y representan la media \pm DE de 3 experimentos diferentes.

1.1.3.c.- Inhibición de la unión de ASOR con galactosa:

Puesto que los residuos terminales de las cadenas hidrocarbonadas de la molécula de ASOR son Gal, realizamos ensayos de inhibición con una dosis determinada de la proteína marcada ($0.11 \mu\text{M}$) en presencia de diferentes concentraciones de este carbohidrato (desde 0.01 hasta 1 M). Como se observa en la figura 16, el desplazamiento de la unión de ASOR debido a la Gal es casi total. Los porcentajes de inhibición varían desde un 42% (con una concentración de 0.01 M) hasta un 80% (con 1 M de Gal). Estos resultados podrían indicar que en las células mesangiales de rata existe un receptor para asialoglicoproteínas, con especificidad para los residuos de Gal.

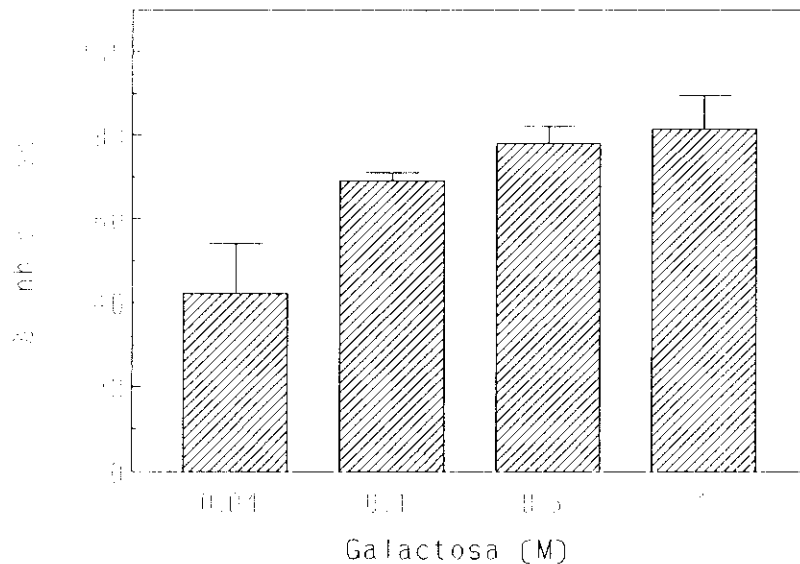


Figura 16: Inhibición de la unión de ASOR con Gal: Las células mesangiales se preincubaron durante 45 minutos a 4°C con varias concentraciones de Gal, antes de añadir ^{125}I -ASOR ($0.11 \mu\text{M}$). Los porcentajes de inhibición se calculan con respecto al control (proteína unida en ausencia de carbohidrato) y representan la media \pm DE de 4 experimentos realizados por duplicado. La significación respecto del control fue de $p < 0.001$.

1.1.3.d.- Inhibiciones cruzadas entre IgA, desIgA y ASOR:

Hasta el momento hemos demostrado la existencia de dos receptores diferentes en las células mesangiales. El primer tipo es el receptor para la IgA, capaz de unir esta inmunoglobulina en su forma molecular intacta o parcialmente desializada, a través de la región Fc. El otro receptor analizado en las células mesangiales es específico de carbohidratos y presenta afinidad por las Gal contenidas en la molécula del orosomucoide desializado.

Estudiamos en este apartado si existe competencia entre las tres proteínas objeto de nuestro estudio (IgA, desIgA y ASOR) en su unión a las células mesangiales, teniendo en cuenta las dos posibilidades ya comentadas, para confirmar si la unión de la inmunoglobulina tiene lugar a través de dos tipos de sitios de unión o de uno.

Los experimentos de inhibición cruzada se realizaron con una sola dosis de proteína marcada, en presencia de un exceso de las tres proteínas sin marcar, por separado o en combinaciones de dos (tabla III).

La unión de ^{125}I -IgA se inhibe de forma apreciable con IgA y con desIgA, por separado o combinadas. La presencia de ASOR no marcado en el medio sólo desplaza la unión un 25 %. Sin embargo, la unión disminuye cuando se añaden simultáneamente ASOR e IgA (62 % de inhibición) o ASOR y desIgA (51 % de inhibición).

La unión de ^{125}I -desIgA a las células mesangiales se inhibe mayoritariamente con desIgA y con IgA. Aunque el descenso ocasionado por ASOR es menor (36 %), este valor aumenta cuando se añaden ASOR e IgA (62 %) o ASOR y desIgA (64 %) conjuntamente.

En cuanto al desplazamiento del ^{125}I -ASOR unido a las células mesangiales, los porcentajes de inhibición siguen el orden, de mayor a menor: ASOR, desIgA, IgA. Por otro lado, la adición simultánea de desIgA e IgA consiguió desplazar la unión del ASOR hasta un 51 %.

TABLA III
Inhibiciones cruzadas entre IgA, desIgA y ASOR

	¹²⁴ I-IgA	¹²⁵ I-desIgA	¹²⁵ I-ASOR
IgA	58 ± 3	49 ± 2	34 ± 8
desIgA	48 ± 4	60 ± 3	43 ± 8
ASOR	25 ± 2	36 ± 3	61 ± 7
IgA + desIgA	69 ± 5	69 ± 4	51 ± 7
IgA + ASOR	62 ± 6	62 ± 2	56 ± 3
desIgA + ASOR	51 ± 5	64 ± 4	64 ± 4

Las células mesangiales se preincubaron con 400 µg/ml de las proteínas no marcadas durante 45 minutos antes de añadir las proteínas marcadas (1 µg/ml). Los resultados se indican como porcentajes de inhibición respecto al control (proteína unida en ausencia de inhibidor). Los datos se expresan como media ± DE y corresponden a 4 experimentos realizados por duplicado. La significación fue de $p < 0.01$ en todos los casos.

Todos estos resultados indican que los tres tipos de ligando compiten en parte para unirse a las células mesangiales, por lo que podría esperarse que en las células mesangiales existe un receptor del tipo Fc, que uniría IgA y desIgA, y un receptor para asialoglicoproteínas, capaz de unir IgA y desIgA a través de sus residuos hidrocarbonados.

1.2.- AISLAMIENTO DE LOS RECEPTORES DE IgA EN LAS CELULAS MESANGIALES:

1.2.1.- Purificación de los receptores de la membrana celular:

El aislamiento de los receptores para IgA de las membranas plasmáticas de las células mesangiales se realizó utilizando técnicas de cromatografía de afinidad. En la literatura se han descrito algunos anticuerpos monoclonales específicos para el receptor Fc α de células monocíticas humanas [44, 203]. Estos anticuerpos resultan ideales para el aislamiento de receptores de IgA, pues presentan una afinidad muy elevada y gran eficiencia en el reconocimiento. Sin embargo, en nuestro laboratorio no hemos estado al alcance de ninguno de estos anticuerpos monoclonales.

Como ya se ha comentado en los anteriores apartados, los ensayos de unión de IgA marcada a las células mesangiales nos han permitido calcular una constante de afinidad relativamente elevada. Por ello, consideramos oportuno utilizar la propia IgA como ligando para purificar el receptor de las células mesangiales. Como control positivo en todos los experimentos se utilizó la línea monocítica U937, en la que ya se ha descrito la existencia de receptores del tipo Fc α [54, 55, 203].

Las células se marcaron con ^{125}I mediante una técnica suave que no deteriora las células y las membranas se solubilizaron por tratamiento con el detergente no iónico NP-40. La fracción de membranas solubilizadas se prepurificó inicialmente pasándola por una pequeña columna de Sepharosa-BSA. Es muy importante eliminar los receptores Fc para IgG, pues podrían dar luego reacción cruzada con la IgA y conducir a resultados erróneos. Estos receptores para IgG quedaron retenidos en un gel de Sepharosa-IgG. El sobrenadante obtenido después de estos dos pasos previos se adsorbió posteriormente con un gel de Sepharosa-IgA. La fracción retenida en la columna se eluyó con tampón de muestras de electroforesis y se analizó por SDS-PAGE, tanto en condiciones reductoras (resultados no mostrados) como no reductoras.

En la figura 17A se muestra la tinción con plata de uno de los geles realizados en condiciones no reductoras. En el carril correspondiente a las células mesangiales de rata se observa la presencia de una banda mayoritaria con un peso molecular aproximado de 60 kDa

(rango de 55 a 66 kDa). Esta banda es coincidente con la banda procedente de las células U937, aunque algo menos ancha. En la autorradiografía de dicho gel aparece una única banda, tanto en el carril de células mesangiales como en el de U937.

En algunos casos, el calentamiento de las muestras en tampón de electroforesis se substituyó por la elución de la fracción retenida en la columna de Sepharosa-IgA mediante sucesivos lavados con ácido acético 0.5 M. Las fracciones eluidas se neutralizaron y se sometieron a electroforesis. En la figura 17B se observa que el resultado de ambos tratamientos es análogo: una única banda procedente de las membranas de células mesangiales, con un peso molecular aproximado de 60 kDa, coincidente con el receptor aislado de las células U937.

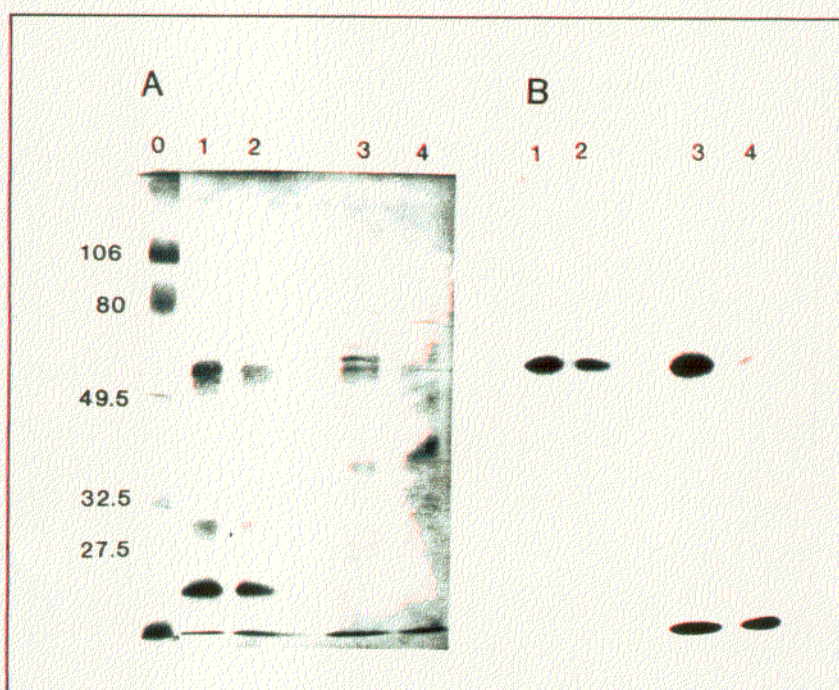


Figura 17: Aislamiento de los receptores de IgA de células mesangiales de rata y U937: Las células U937 (carriles 1 y 3) y las células mesangiales (carriles 2 y 4) se marcaron y se solubilizaron con tampón de lisis. Las membranas se prepurificaron con Sepharosa-BSA y Sepharosa-IgG y luego se incubaron con Sepharosa-IgA. La fracción retenida se eluyó por calentamiento con tampón de muestras de electroforesis (carriles 1 y 2) o por lavados sucesivos con ácido acético 0.5 M (carriles 3 y 4). Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE (10% acrilamida) en condiciones no reductoras. Los geles se tiñeron con plata (A), se secaron y autorradiografiaron (B). En el carril 0 se indican los pesos moleculares de los marcadores, en kDa: fosforilasa B (106), BSA (80), ovoalbúmina (49.5), anhidrasa carbónica (32.5), inhibidor de tripsina de soja (27.5). Experimento representativo de otros 3 realizados.

Se realizaron otros experimentos sustituyendo la columna de Sepharosa-IgA por una de Sepharosa-desIgA, para determinar si los receptores para ambas proteínas en las células mesangiales eran idénticos o diferentes. La figura 18 muestra la tinción con plata de uno de los geles, en donde se observa que tanto IgA como desIgA se unen a una misma proteína en la membrana celular de las células mesangiales, ya que las bandas procedentes de cada una de ellas presentan el mismo peso molecular.

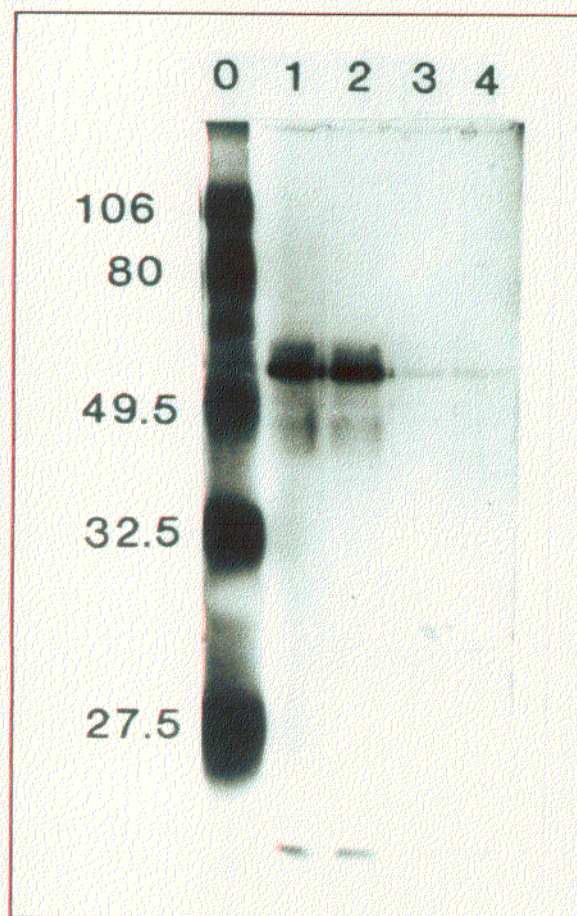


Figura 18: Receptores de IgA y desIgA en las células mesangiales: Las fracciones solubles de membranas procedentes de dos cultivos distintos de células mesangiales de rata se prepurificaron con Sepharosa-BSA y Sepharosa-IgG y luego se separaron en dos alícuotas. Una parte se incubó con Sepharosa-IgA (carriles 1 y 3) y la otra con Sepharosa-desIgA (carriles 2 y 4). Las proteínas retenidas en ambas columnas se solubilizaron en tampón de electroforesis, se analizaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y se tiñeron con plata. En la parte izquierda se indican los pesos moleculares de los patrones, en kDa.

1.2.2.- Especificidad del receptor para IgA:

En algunos experimentos, antes de purificar los receptores de IgA por cromatografía de afinidad, se incubaron los lisados de las células mesangiales con diferentes concentraciones de IgA soluble. Es de esperar que la IgA soluble compita con la IgA unida a Sepharosa en la unión a los receptores de la membrana celular.

En la figura 19 se muestran los resultados correspondientes al análisis densitométrico de las bandas obtenidas en un experimento representativo. La presencia de IgA soluble en el medio causa una disminución de la intensidad de la banda de 60 kDa. El porcentaje de intensidad respecto del control decrece en función de la concentración de IgA soluble. Este hecho no ocurre cuando la purificación del receptor se realiza en presencia de un exceso de IgG soluble.

Estos resultados indican que existe especificidad en la unión del receptor de membrana de las células mesangiales a la IgA, ya que dicha unión es desplazable por IgA pero no por IgG.

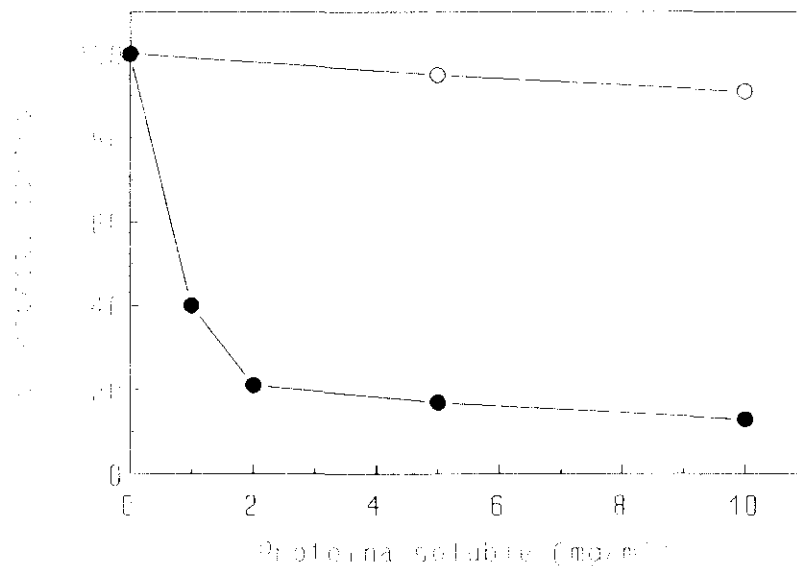


Figura 19: Especificidad de la unión de IgA al receptor de membrana de las células mesangiales:

La purificación del receptor de IgA se realizó con Sepharosa-IgA, en presencia de varias concentraciones de IgA (●) o IgG (○). Las proteínas de membrana retenidas se analizaron por SDS-PAGE y las bandas obtenidas en la autorradiografía se densitometraron. Los resultados se expresan como porcentaje respecto de la intensidad de la banda medida en ausencia de inhibidor. Experimento representativo.

Por otro lado, el receptor $Fc\gamma$ de las células mesangiales eluído de una columna de Sepharosa-IgG presenta un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, distinto del receptor de IgA en las mismas células (figura 20). Estos resultados corroboran una vez más la especificidad por IgA del receptor aislado de células mesangiales de rata.

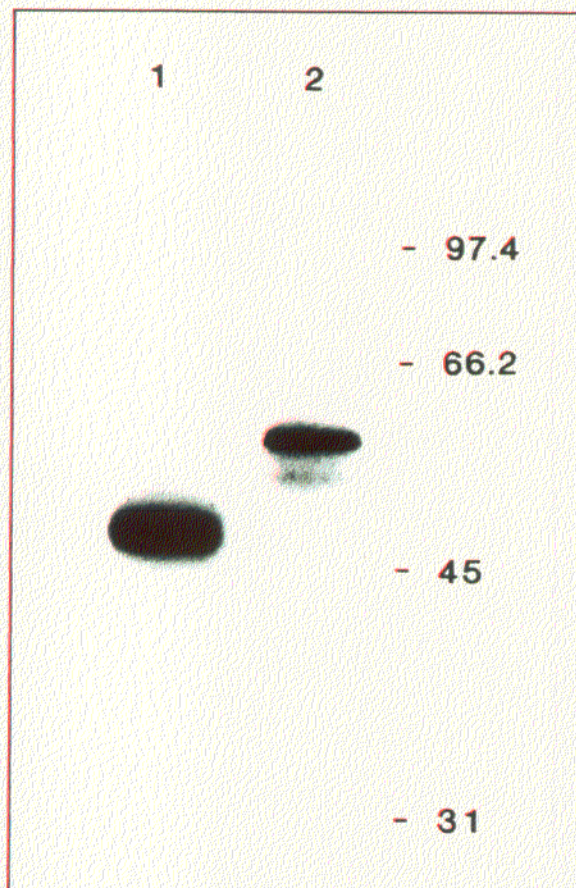


Figura 20: Diferencias entre el receptor de IgG y el de IgA en las células mesangiales de rata:

La fracción soluble de las membranas de las células mesangiales marcadas se dividió en dos alícuotas, que se incubaron por separado con Sepharosa-IgG (carril 1) y con Sepharosa-IgA (carril 2). Las proteínas retenidas se analizaron por electroforesis y posteriormente se autorradiografiaron los geles. Experimento representativo de 2 realizados.

1.2.3.- Modulación de la expresión del receptor de IgA:

Varios autores han demostrado que la IgA polimérica y los ésteres de forbol, como el PMA, inducen una sobreexpresión del receptor de IgA en las células U937, mientras que este efecto no se observa con IFN- γ [54, 55, 203]. En nuestro sistema intentamos determinar si se producía algún cambio en los receptores de IgA de la membrana de las células mesangiales en presencia de 10^{-8} M de PMA o de 2.5 mg/ml de IgA (monomérica o agregada por calor). Todas las incubaciones se llevaron a cabo durante un tiempo de 18 horas, ya que a tiempos más cortos (3 y 6 horas) no se observó un aumento considerable en el número de receptores de la membrana celular (resultados no mostrados). En la figura 21 se muestra un experimento significativo de los llevados a cabo.

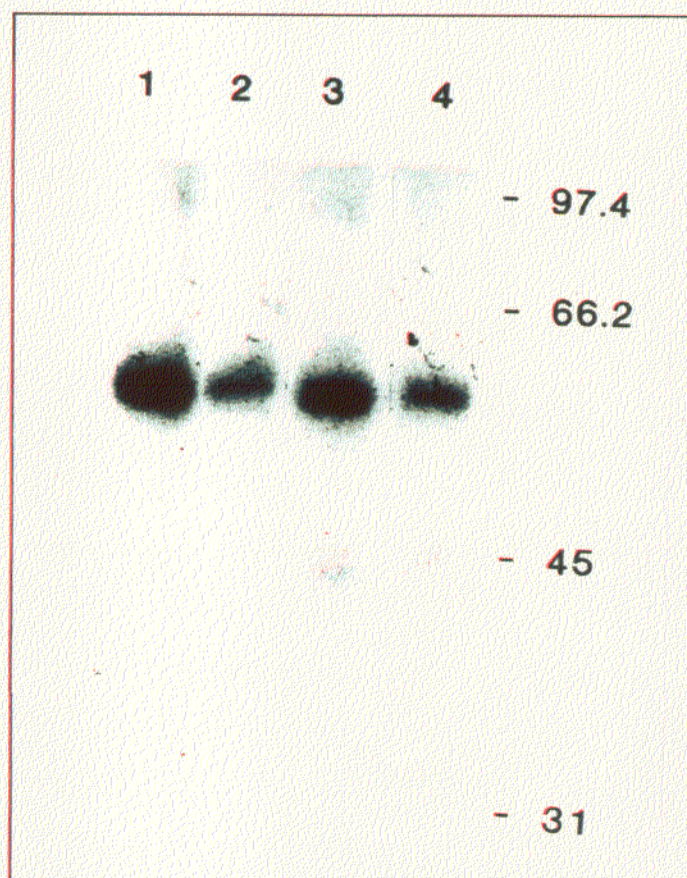


Figura 21: *Modulación de la expresión del receptor de IgA:* Las células U937 (carril 1) y las células mesangiales de rata (carriles 2-4) se incubaron durante 18 horas con PMA (carriles 1 y 4), medio de cultivo (carril 2) y AIgA (carril 3). Finalizado este tiempo se aislaron los receptores de IgA de las membranas celulares y se analizaron por SDS-PAGE. Autorradiografía representativa de 3 experimentos realizados.

En la tabla IV aparece el resumen de todos los resultados obtenidos. La presencia de IgA monomérica o de agregados de IgA (AIgA) en el medio de incubación induce un aumento en el número de receptores de IgA en las células mesangiales. La intensidad de la banda aumenta un 56% y un 39%, respectivamente, en relación con el valor control de células sin estimular.

La incubación en presencia de PMA no provoca un aumento significativo de los receptores en células mesangiales, pero sí lo hace en las células U937, tomadas como control positivo. Esta discrepancia entre las células mesangiales y las células U937 en cuanto a la estimulación por PMA podría ser debida a que ambas células poseen rutas de activación diferentes, o simplemente, a que las condiciones óptimas (dosis y tiempo de incubación) de activación con PMA de las células mesangiales no coinciden con las descritas para U937.

En ninguno de los dos tipos celulares se apreció estimulación de la expresión de los receptores de IgA en la membrana celular cuando la incubación se realizó con 100 U/ml de IFN- γ . Sin embargo, este estímulo causó un 75% de incremento sobre los receptores Fc γ expresados por las células mesangiales.

TABLA IV

Modulación de la expresión del receptor de IgA de membrana en células mesangiales

	% respecto del control
Control	100
PMA (10^{-8} M)	115 ± 7
AIgA (2.5 mg/ml)	156 ± 12 (*)
IgA (2.5 mg/ml)	139 ± 8 (*)
IFN- γ (100 U/ml)	103 ± 2

Los receptores de IgA se purificaron después de incubar las células mesangiales durante 18 horas con los estímulos indicados. Los resultados indican el análisis densitométrico de las bandas obtenidas y se expresan como porcentaje respecto del valor de células sin estimular. Media \pm DE de 4 experimentos. El símbolo entre paréntesis indica la significación respecto del control: $p < 0.05$.

1.3.- EXPRESION DEL mRNA DEL RECEPTOR DE IgA:

1.3.1.- Hibridación del mRNA con la sonda pHuFc α R:

Para los estudios de hibridación de RNA se utilizó la sonda pHuFc α R, construída por Maliszewski [55]. En la secuencia de bases de este plásmido está contenida la región que codifica el receptor para IgA descrito en células U937.

En nuestras condiciones experimentales esta sonda hibrida con el mRNA aislado de las células mesangiales de rata y humanas (figura 22A). El tamaño del mRNA observado corresponde aproximadamente a unas 2.8 kb. Esta banda es similar, aunque menos abundante, que la obtenida de células U937 estimuladas con PMA, utilizadas como control positivo del experimento. No se observa ninguna banda en el carril correspondiente a la línea celular de fibroblastos renales NRK49-F, usada en estos experimentos como control negativo de la expresión del mRNA del receptor de IgA.

Estos resultados sugieren que las células mesangiales poseen un receptor para IgA que puede ser incluido en el grupo de los receptores Fc α , descrito en otros tipos celulares, como monocitos, neutrófilos o macrófagos.

En otros experimentos determinamos la expresión del mRNA del receptor Fc γ en las células mesangiales de rata, utilizando una sonda que contenía el cDNA del receptor Fc γ RII de macrófagos murinos. Los análisis de Northern blot confirmaron los resultados ya descritos [92], demostrando que las células mesangiales contienen el mRNA que codifica este receptor Fc γ , con un tamaño aproximado de 2 kb, claramente diferente del mRNA del receptor para IgA (figura 22B).

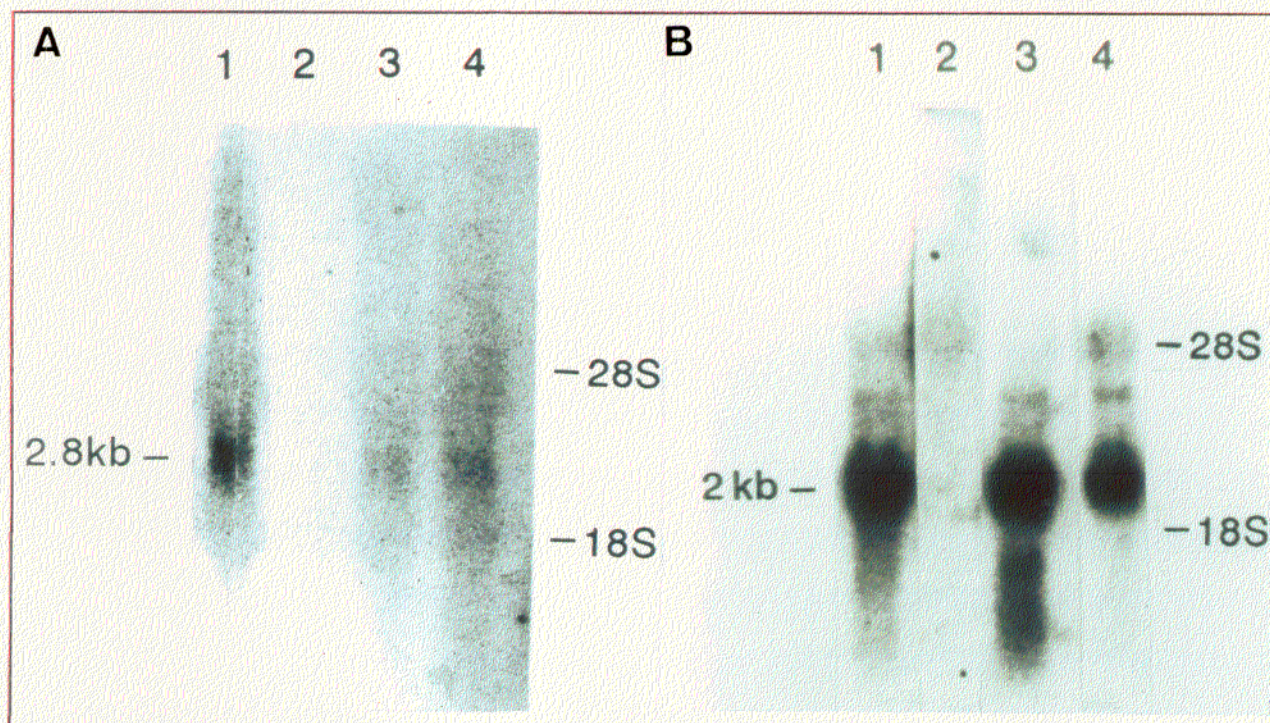


Figura 22: Expresión de los receptores de IgA y de IgG en diferentes tipos celulares: El RNA total de las células U937 (carril 1), NRK49F (carril 2), células mesangiales de rata (carril 3) y humanas (carril 4) se extrajo según el protocolo indicado. Se aplicaron 30 μ g de RNA en los pocillos de un gel de agarosa y se realizó la electroforesis y la transferencia a membranas de nylon. Las membranas se prehibridaron, se hibridaron con las sondas pHuFcαR (A) o FcγRIIa (B) y se autorradiografiaron. En la parte izquierda se indica el tamaño del mRNA correspondiente y en la derecha las posiciones de los RNA ribosomales 18S y 28S. Experimento representativo.

1.3.2.- Regulación de la expresión del mRNA del receptor de IgA:

Las células mesangiales de rata se incubaron durante 12 horas en presencia de PMA (10^{-8} M) o de 2.5 mg/ml de IgA (monomérica o agregada por calor). Elegimos el tiempo de 12 horas pues a tiempos más cortos de incubación no observamos un aumento apreciable de la expresión del mRNA del receptor Fcα (resultados no mostrados).

Como se muestra en la figura 23, la presencia de ambas formas moleculares de la IgA induce un aumento de la expresión del mRNA del receptor en las células mesangiales. La intensidad de la banda aumenta aproximadamente un 60% respecto del basal en presencia de AIgA, y un 25% con IgA monomérica. La incubación con PMA no estimula la expresión

de AlGA, y un 25 % con IgA monomérica. La incubación con PMA no estimula la expresión del mRNA del receptor $Fc\alpha$, al contrario de lo que ocurre en las células U937.

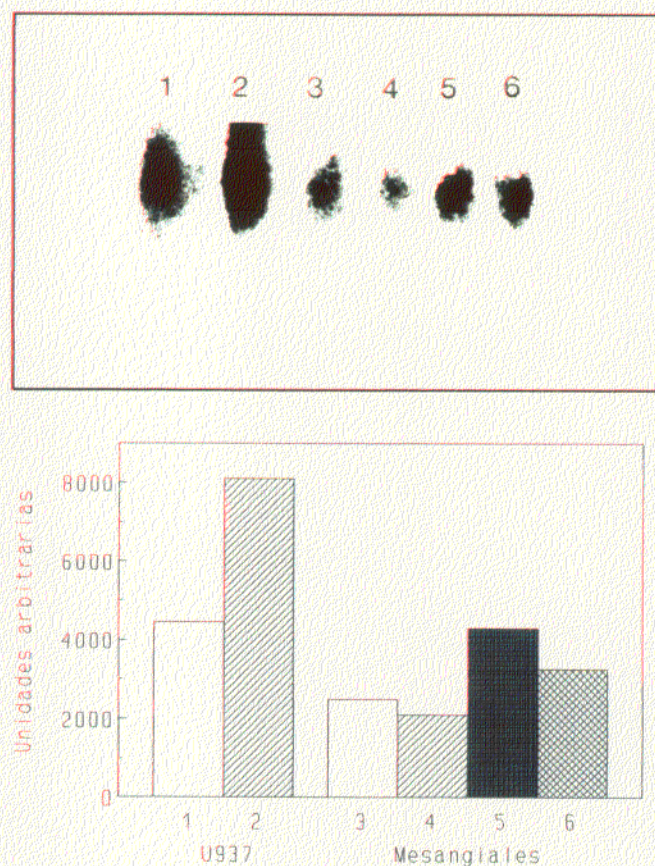


Figura 23: Modulación de la expresión del receptor para IgA en las células mesangiales de rata:

Las células U937 (carriles 1 y 2) y las células mesangiales (carriles 3-6) se incubaron durante 12 horas en medio de cultivo (carriles 1 y 3) o en presencia de 10^{-8} M de PMA (carriles 2 y 4), 2.5 mg/ml de AlGA (carril 5) o IgA monomérica (carril 6). Finalizada la incubación, se extrajo el RNA total y se procesó según los protocolos ya indicados. La parte superior muestra la autorradiografía de una de las membranas y en la parte inferior se indica, en unidades arbitrarias, la cuantificación densitométrica de las bandas de 2.8 kb. Experimento representativo de 2 realizados.

2.- ESTUDIOS FUNCIONALES DEL RECEPTOR DE IgA EN LAS CELULAS MESANGIALES

Una vez estudiados algunos aspectos bioquímicos y moleculares de la interacción entre la IgA y las células mesangiales, vamos a determinar qué funciones de la célula mesangial se ven activadas por dicha interacción. Los resultados que se comentan en esta sección describen la capacidad de las células mesangiales de internalizar y degradar la IgA que han unido específicamente. Entre las vías de transducción de la señal, estudiaremos si se produce movilización del calcio intracelular cuando la IgA se une a las células mesangiales. Determinaremos más adelante si, como consecuencia de la activación celular, se pone en marcha la maquinaria de síntesis y liberación de algunos mediadores inflamatorios, concretamente de las citocinas TNF α e IL-6. En último lugar estudiaremos los efectos a largo plazo de esta interacción, determinando si existen variaciones en la capacidad mitogénica de las células mesangiales.

2.1.- CATABOLISMO DE LAS PROTEINAS:

En general, después de la unión de una proteína a su receptor en la membrana plasmática celular, pueden seguirse dos caminos alternativos: disociación del receptor o endocitosis mediada por el receptor, con la subsiguiente degradación de la proteína, normalmente en los lisosomas.

Los siguientes experimentos van encaminados a determinar el destino de la IgA una vez que está unida a su receptor en la célula mesangial. El catabolismo de la IgA se comparó con el de la IgG, tanto en células mesangiales como en macrófagos peritoneales.

2.1.1.- Unión, internalización y degradación de IgA, desIgA e IgG por las células mesangiales:

Los experimentos de catabolismo se realizaron con células mesangiales de rata, utilizando como ligando IgA radiactiva, tanto en estado monomérico (IgA) como en forma de agregados solubles, obtenidos por calentamiento a 63°C (AIgA). En estos ensayos se estudió la capacidad de las células mesangiales de unir, internalizar y degradar IgA.

Las células mesangiales se incubaron durante 4 horas a 4°C con una dosis única de IgA monomérica o de AIgA. Al cabo de este tiempo se eliminó la proteína no unida y se realizaron incubaciones a 37°C durante varios periodos de tiempo. La radiactividad precipitada con TCA, la soluble y la unida a las células nos permitieron calcular, para cada tiempo, los porcentajes de disociación, degradación y asociación a células, respectivamente, según las ecuaciones definidas en la sección de *Materiales y Métodos*.

En la figura 24A se muestra el porcentaje de disociación de la IgA unida en función del tiempo de incubación a 37°C. La IgA monomérica aparece en el medio más rápidamente que los AIgA. Después de 5 minutos de incubación a 37°C, el 52% de la IgA monomérica que inicialmente estaba unida a la superficie celular aparece en el medio, mientras que del total de AIgA unidos solo se disocia un 27%. El grado de disociación va aumentando con el tiempo, estabilizándose a los 30-60 minutos, con valores de disociación elevados.

Los resultados anteriores de disociación son concordantes con los obtenidos al medir la fracción de radiactividad asociada a las células (figura 24B). Después de 5 minutos de incubación a 37°C la fracción de ¹²⁵I-IgA asociada a la células desciende hasta un 44% para la proteína monomérica, y hasta un 65% para los agregados. Estos porcentajes siguen decreciendo y se estabilizan aproximadamente 60 minutos después de iniciar la incubación a 37°C.

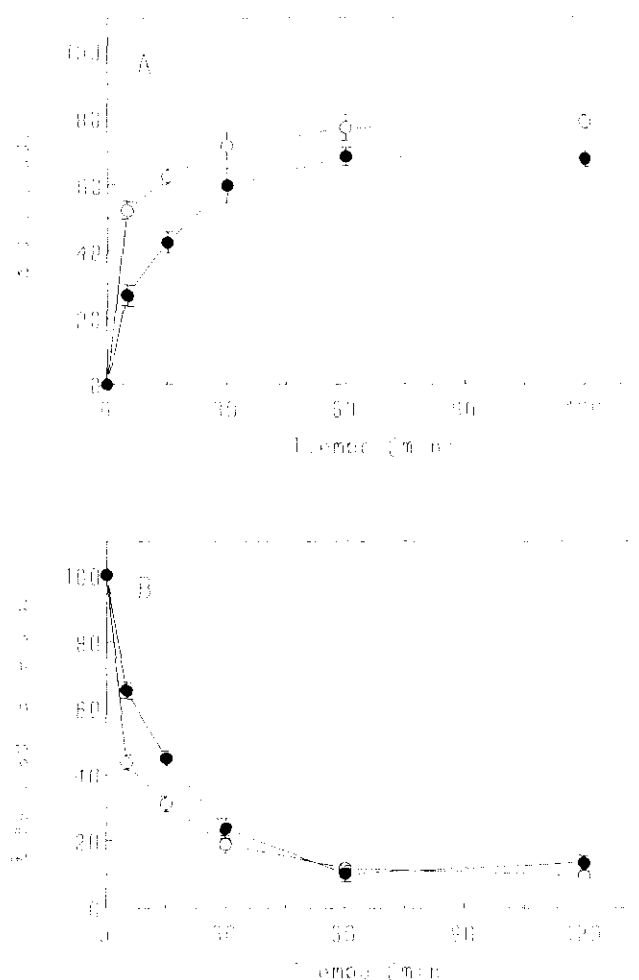


Figura 24: *Curvas de disociación y unión a 37°C de la IgA a las células mesangiales:* Las células mesangiales de rata se incubaron en placas de 6 pocillos durante 4 horas a 4°C en tampón HEPES-BSA conteniendo 2 µg/ml de ^{125}I -IgA (○) o de ^{125}I -AlgA (●). Después de eliminar las proteínas no unidas, las células se incubaron a 37°C. A los tiempos indicados se recogió el sobrenadante de las células y las proteínas se precipitaron con TCA al 10%. La radiactividad contenida en el precipitado permitió calcular el grado de disociación (A). Las células se despegaron por tratamiento con Triton X-100 al 1% y se determinó la fracción de radiactividad asociada a las células (B). Los resultados se expresan en porcentaje respecto de la cantidad total de radiactividad en cada pocillo y son la media \pm DE de 4 experimentos realizados por triplicado.

Finalmente se midió la fracción de radiactividad soluble en TCA que apareció en el medio de incubación, es decir, el porcentaje de degradación de la proteína internalizada. Como se indica en la figura 25, puede detectarse radiactividad soluble en TCA incluso a los 5-15 minutos de incubación. El porcentaje de degradación es máximo a los 60 minutos, para

estabilizarse o incluso decrecer un poco hasta los 120 minutos. Los valores para la degradación de los AlgA varían desde un 8%, a 5 minutos, hasta un 22%, a 120 minutos.

Estos resultados ponen de manifiesto la diferencia entre las dos formas moleculares de la IgA. Las células mesangiales son capaces de degradar una pequeña cantidad de IgA monomérica, mientras que los porcentajes de degradación de los AlgA son significativamente mayores ($p < 0.01$).

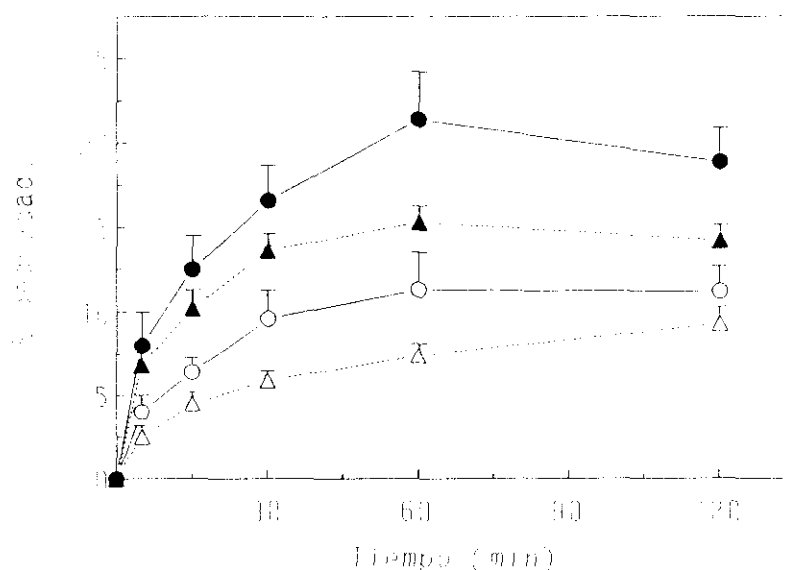


Figura 25: Degradación de IgA e IgG por las células mesangiales de rata: La unión de las proteínas (2 $\mu\text{g/ml}$) se realizó a 4°C y después se realizaron incubaciones a 37°C durante diferentes intervalos de tiempo, como se indica en la figura anterior. Los porcentajes de degradación de las proteínas se determinaron a partir de la radiactividad presente en la fracción del sobrenadante no precipitada por TCA. Los símbolos indican: ○, IgA; ●, AlgA; △, IgG; ▲, AlgG. Resultados obtenidos a partir de 4 experimentos realizados por triplicado (media \pm DE).

Algunos experimentos de catabolismo se realizaron comparativamente utilizando IgA e IgG (en forma monomérica o agregada), para determinar si el destino de estas proteínas después de interaccionar con las células mesangiales a través de su receptor Fc era diferente o no. Analizamos en un principio las diferencias en cuanto al grado de unión de las

proteínas a las células mesangiales, después de 4 horas de incubación a 4°C (tabla V). Los resultados demuestran que la unión de IgA a las células mesangiales es algo mayor que la unión de IgG, pero estas diferencias no llegan a ser significativas. En ambos casos, el porcentaje de unión de las proteínas en estado agregado es significativamente mayor que el de las proteínas en forma monomérica. Por otro lado, una vez unidas a la célula mesangial, la cinética de degradación de IgA e IgG es similar, alcanzándose el máximo a los 60 minutos de incubación a 37°C (figura 25).

TABLA V
Unión de IgA e IgG (monomérica y agregadas por calor) a células mesangiales

	IgA	IgG
monomérica	1.5 ± 0.6	1.2 ± 0.3
agregada	3.2 ± 0.7 **	2.7 ± 0.5 *

Las células mesangiales de rata se incubaron en HEPES-BSA con 2 µg/ml de proteínas marcadas durante 4 horas a 4°C. Después de ser solubilizadas se determinó la radiactividad unida a las células, restando el fondo en cada experimento. Los datos se expresan en porcentaje respecto del total añadido, como media ± DE de 4 experimentos por triplicado. Los asteriscos indican el análisis estadístico de la diferencia entre las proteínas agregadas y en estado monomérico: *, p < 0.05; **, p < 0.001.

En algunos experimentos se utilizó como ligando la desIgA, tanto en estado monomérico como en forma de agregados solubles (desIgA). En todos los estudios realizados, los porcentajes de disociación, unión celular y degradación fueron extremadamente similares a los obtenidos con la IgA. Por ejemplo, a 15 y 60 minutos de incubación a 37°C, los porcentajes de degradación de los A IgA por las células mesangiales fueron de 12.5 ± 2 y 21.4 ± 2.8 (media ± DE), respectivamente; los resultados obtenidos para los A desIgA fueron 13.6 ± 0.5 (15 minutos) y 22.7 ± 1.9 (60 minutos). A todos los tiempos estudiados el análisis estadístico entre los valores de IgA y los de desIgA arrojó un

valor de $p > 0.05$, lo que indica diferencias no significativas entre ambas proteínas. Por tanto, a pesar de las diferencias observadas entre IgA y desIgA en cuanto a su unión a las células mesangiales, la capacidad de estas células para degradar ambas proteínas es idéntica.

Los resultados de degradación obtenidos no se deben, en ningún caso, a la inestabilidad de las proteínas marcadas, pues la incubación previa de IgA, IgG o desIgA (monoméricas o agregadas) durante 2 horas a 37°C en ausencia de células no varía la radiactividad soluble en TCA detectada en los ensayos (resultados no mostrados).

2.1.2.- Catabolismo dependiente de la región Fc de la IgA y de la concentración de calcio en el medio:

En este tipo de estudios es importante resolver si la internalización y degradación de la IgA por las células mesangiales tiene lugar a través de receptores específicos para la región Fc de la inmunoglobulina. Para ello, se realizaron experimentos de catabolismo similares a los anteriores, pero en presencia de los fragmentos Fc y F(ab) de la IgA, determinando el porcentaje de degradación y la fracción radiactiva asociada a las células (figura 26).

Según se indica en la figura 26A, la coincubación de los ^{125}I -AIgA y el fragmento Fc causa un descenso gradual de la fracción asociada a células, detectándose a 120 minutos tan solo un 33 % del valor inicial (porcentaje de asociación en ausencia de Fc). El porcentaje de degradación de los AIgA disminuye considerablemente en presencia de una concentración de $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ del fragmento Fc de la IgA, obteniéndose a 120 minutos una inhibición del 70 % respecto del total degradado en ausencia de Fc (figura 26B).

Ninguno de estos dos parámetros estudiados (asociación y degradación) se ve afectado por la presencia en el medio del fragmento F(ab) de la IgA, pues las inhibiciones conseguidas no superan el 15 % (figura 26 A y B).

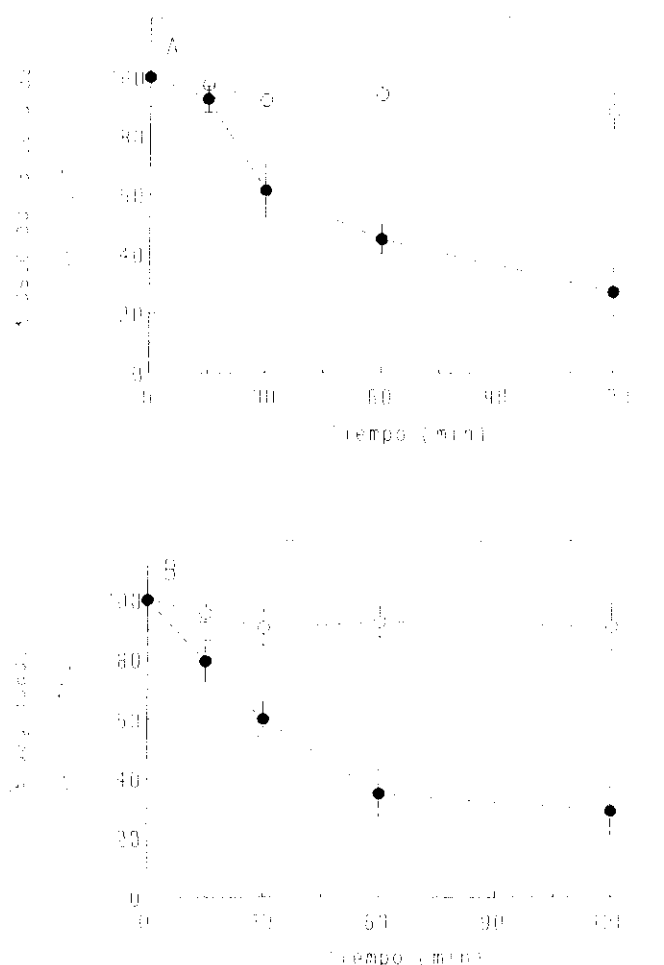


Figura 26: Especificidad del catabolismo de los AlGA en las células mesangiales de rata: Se realizó la unión de $2 \mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -AlGA a 4°C durante 4 horas. Las incubaciones a 37°C se llevaron a cabo en presencia o ausencia de $100 \mu\text{g/ml}$ de los fragmentos Fc (●) y F(ab) (○) de la IgA, obtenidos por digestión con la proteasa de *Haemophilus Influenzae*. A los tiempos indicados se determinó la fracción de proteína asociada a las células (A) y la que había sido degradada (B). En cada tiempo los datos se expresan como porcentaje del valor total en ausencia de inhibidor y son la media \pm DE de 4 experimentos (por triplicado).

Es importante determinar los requerimientos de Ca^{2+} que necesita la célula mesangial para realizar los procesos implicados en el catabolismo. Para ello, se realizaron los experimentos de catabolismo de AlGA, AlgG y AdesIgA en ausencia de calcio en el medio de incubación, conseguida con adición del quelante de calcio EDTA, a una concentración de 5mM . Como se observa en la tabla VI, el porcentaje de degradación a 60 minutos y

37°C de las proteínas por las células mesangiales disminuye de forma considerable, alrededor de un 50%, cuando se elimina el calcio del medio de incubación. Sin embargo, los porcentajes de unión a 4°C no se ven afectados en gran medida por la presencia de EDTA, ya que los valores de inhibición están alrededor del 20%. Estos datos ponen de manifiesto que la presencia de iones Ca^{2+} en el medio no es un requisito fundamental para que las inmunoglobulinas se unan a su receptor en la membrana de las células mesangiales, pero si es determinante para que éstas puedan ser endocitadas y, posteriormente, degradadas.

TABLA VI
Dependencia de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la unión y degradación de los agregados

	% inhibición	
	Unión (4h, 4°C)	Degradación (1h, 37°C)
AlgA	19 ± 2	53 ± 7
AlgG	22 ± 8	55 ± 12
AdesIgA	15 ± 6	51 ± 3

Las células mesangiales se incubaron con 2 µg/ml de los agregados en medio HEPES-BSA conteniendo 1mM de calcio, en ausencia o en presencia de EDTA 5 mM. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición ($p < 0.05$) respecto de la unión a 4°C o la degradación a 37°C en medio con calcio y son la media ± DE de 4 experimentos por duplicado.

2.1.3.- Estudios comparativos en otros tipos de células:

Como control adicional a los experimentos ya comentados, se realizaron ensayos de catabolismo utilizando macrófagos peritoneales, células con una gran capacidad fagocítica [33, 61, 97, 205, 206]. En la figura 27 se muestra la degradación a 60 minutos y 37°C de los agregados de IgG, IgA y desIgA, tanto en macrófagos peritoneales de rata como en

células mesangiales de rata. Los macrófagos peritoneales son capaces de procesar una elevada cantidad de agregados (porcentajes comprendidos entre 30 y 40%), siendo los AlgG los más catabolizados. Estos valores son, en cualquier caso, superiores a los obtenidos con células mesangiales, que nunca alcanzan el 25%. Sin embargo, mientras los macrófagos peritoneales procesan mayoritariamente AlgG, las células mesangiales degradan en mayor proporción los AlgA y AdesIgA que los AlgG.

Estos resultados indican que la capacidad de las células mesangiales de fagocitar y degradar inmunoglobulinas es mucho menor que la de los macrófagos peritoneales, pero, sin embargo, es mayor que la descrita en los monocitos y líneas relacionadas [40, 61].

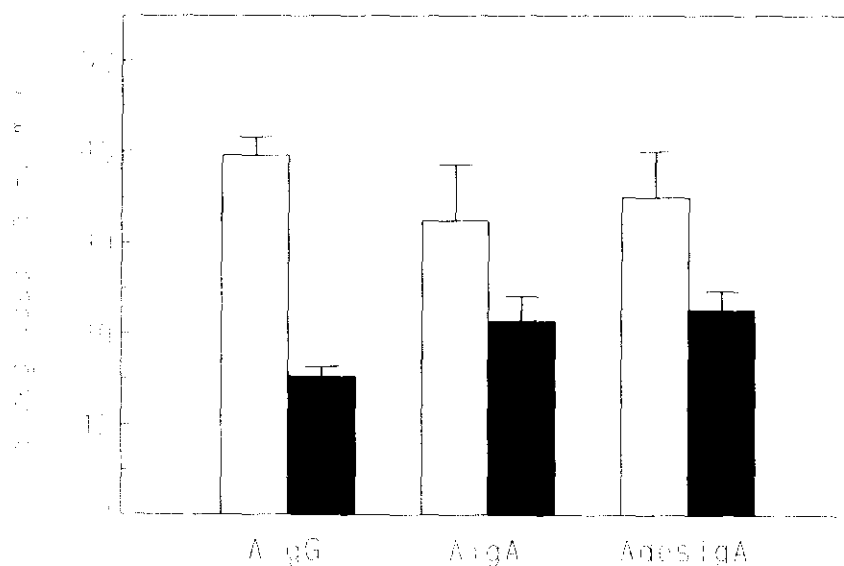


Figura 27: Degradación de IgG, IgA y desIgA por macrófagos peritoneales y células mesangiales:

Igual número (10^5 /pocillo) de macrófagos peritoneales de rata (□) y de células mesangiales de rata (■) se incubaron a 4°C en tampón HEPES-BSA conteniendo 2 µg/ml de AlgG, AlgA o AdesIgA. Al cabo de 4 horas se eliminaron las proteínas no unidas y se midió la degradación a los 60 minutos de incubación a 37°C. Los resultados son la media \pm DE de 4 experimentos diferentes, realizados por triplicado.

2.2.- VARIACIONES EN LA CONCENTRACION DE CALCIO INTRACELULAR EN LAS CELULAS MESANGIALES:

Las variaciones de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) constituyen señales de transmembrana en muchos procesos de activación celular vía receptores. Concretamente, se ha demostrado que la activación de las células mesangiales con inmunocomplejos de IgG va acompañada de un incremento del calcio citosólico libre [101]. Esta movilización del calcio intracelular juega un papel importante en la secuencia de sucesos que ocurre durante la activación de las células. En este apartado estudiaremos si el cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ es una de las vías de transducción de la señal al interior de las células mesangiales cuando éstas se activan con IgA.

2.2.1.- Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la IgA:

Las células mesangiales se incubaron con la IgA (en forma monomérica o de agregados solubles) en un medio que contenía 2 mM de Ca^{2+} (tampón KHH) y se realizaron medidas de fluorescencia con el indicador fura-2. La presencia de IgA monomérica produce una mínima movilización del calcio intracelular en las células mesangiales. Sin embargo, la estimulación de las células mesangiales con los AIgA induce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ que depende de la concentración de agregados empleada. Esta respuesta es rápida, se produce aproximadamente 10-20 segundos después de la adición de los agregados. Inicialmente el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ es muy brusco y luego va descendiendo gradualmente con el tiempo de una forma más lenta (figura 28).

Cuando se emplean bajas concentraciones de los AIgA el descenso de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta los niveles basales se observa después de 3-4 minutos de incubación. Sin embargo, a mayores concentraciones de los agregados (de 200 μ g/ml en adelante) el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene incluso después de 4 minutos de incubación.

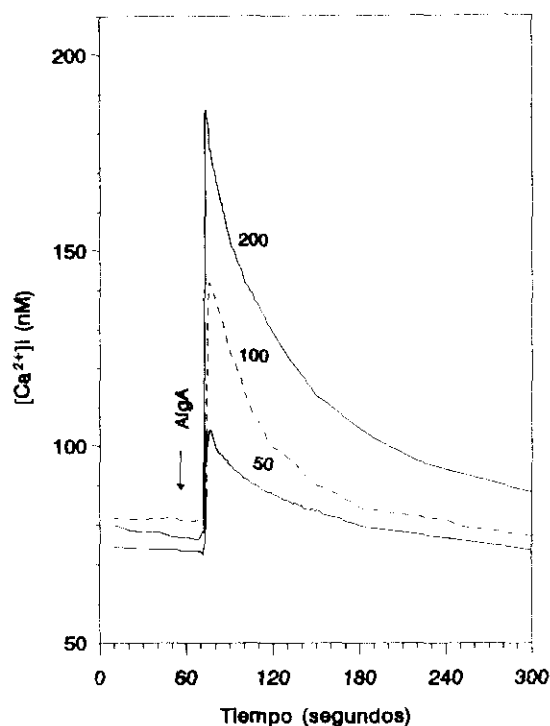


Figura 28: Variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ de las células mesangiales de rata estimuladas con Alga: Las células adheridas a cubres de cristal redondos previamente cargadas con fura-2 ($4 \mu M$) se estimularon a $37^\circ C$ con diferentes concentraciones de Alga (50, 100 y $200 \mu g/ml$) en tampón KHH, siguiéndose las variaciones de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo. Los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ se expresan en nM, calculados según la ecuación de Grynkiewicz (ver *Materiales y Métodos*). La flecha indica el momento de la adición de los estímulos. Experimento representativo de un total de 5 realizados.

En la figura 29 se muestra el resumen de todas las medidas de $[Ca^{2+}]_i$ realizadas en función de la concentración de IgA. Los niveles de calcio intracelular en condiciones basales son de aproximadamente 95 nM. Cuando las células mesangiales se incuban con los Alga se produce un incremento lineal de la $[Ca^{2+}]_i$ dependiente de la dosis de agregados, alcanzándose valores máximos con 1 mg/ml de la proteína (254.5 nM).

En todos los casos estudiados, el incremento producido por los Alga representa aproximadamente un 50% del aumento que inducen otros estímulos más potentes, como la AII o la ET-1, cuyos máximos están alrededor de 500 nM ([207] y resultados no mostrados).

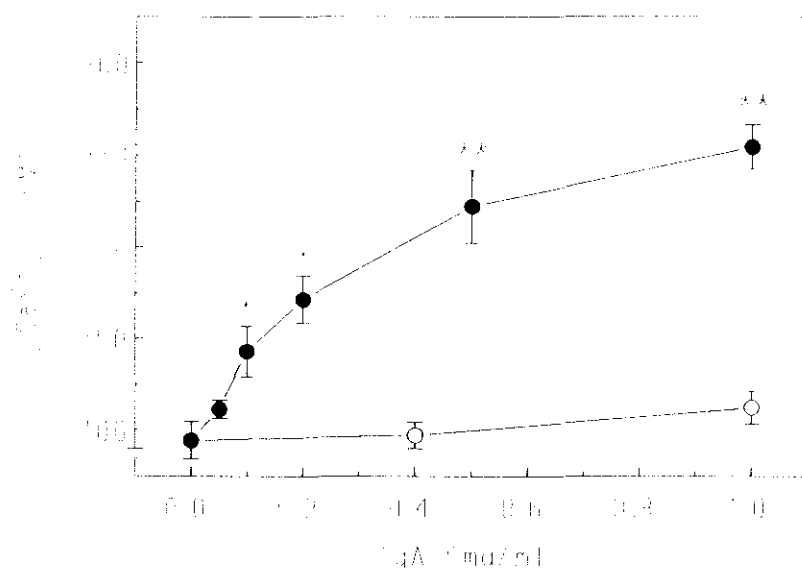


Figura 29: Incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células mesangiales estimuladas con IgA: Las células se cargaron con el indicador fura-2 y se incubaron a 37°C con diferentes dosis de IgA monomérica (●) o AlgA (○). Para cada concentración se tomaron los valores basal y máximo de $[Ca^{2+}]_i$, expresados en nM. Los resultados se representan como media \pm EE de un total de 7-11 experimentos realizados. Los asteriscos indican la significación del análisis estadístico de los datos respecto del basal: *, $p < 0.05$ y **, $p < 0.001$.

La cinética de la movilización del calcio en las células mesangiales inducida por AlgA es diferente de la observada con los AlgG. Para una misma dosis de agregados, el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a los AlgA es mayor que la que producen los AlgG. De un total de 7 experimentos realizados, la línea base asciende desde los niveles basales (aproximadamente 100 nM) hasta 143 ± 14 nM (media \pm EE) en presencia de 100 μ g/ml de AlgA, mientras que el aumento debido a una dosis idéntica de AlgG es de 123 ± 8 nM. Sin embargo, en ambos casos el retorno a los niveles basales se produce de una forma similar (figura 30).

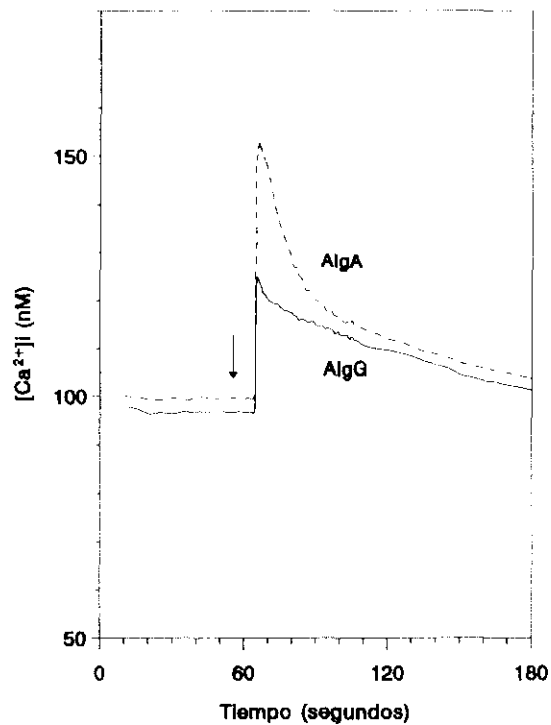


Figura 30: *Diferencias entre los AlG A y los AlG G en las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$:* Las células mesangiales de rata, previamente cargadas con fura-2 ($4 \mu M$), se estimularon a $37^\circ C$ con $100 \mu g/ml$ de AlG A o AlG G en tampón KHH. Las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ se expresan en nM. La flecha indica el momento de la adición de los estímulos. Experimento representativo de un total de 7 realizados.

2.2.2.- Factores que intervienen en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$:

En general, las variaciones en la $[Ca^{2+}]$ del citosol pueden deberse principalmente a dos factores: salida de calcio de los depósitos intracelulares, o aumento del flujo extracelular de calcio. Los siguientes experimentos van encaminados a determinar cuál de estas dos posibilidades tiene lugar en la activación de las células mesangiales por los AlG A.

2.2.2.a.- Contribución del calcio extracelular:

En algunos experimentos se añadió el quelante de calcio EGTA al medio de incubación antes de la adición de los AIGa. Como se observa en la figura 31, la presencia de 5 mM de EGTA no disminuye en gran medida la intensidad del pico producido por los agregados (los descensos están alrededor del 20%, $p < 0.05$). El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ se produce con la misma rapidez en ausencia o presencia de calcio externo. Sin embargo, cuando el EGTA está en el medio, el retorno gradual de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta la línea base es mucho más brusco y prácticamente se completa después de 1 minuto de incubación.

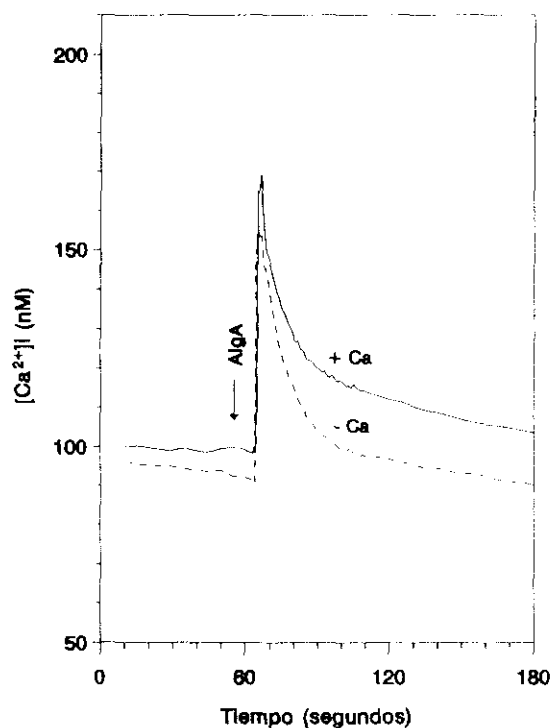


Figura 31: *Influencia del calcio extracelular en las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células mesangiales de rata estimuladas con AIGa:* Las células se cargaron con el indicador fura-2 y se incubaron a 37°C con 200 $\mu\text{g/ml}$ de AIGa, en presencia de 2 mM de calcio en el medio (+ Ca) o en ausencia (- Ca). La eliminación del calcio extracelular se realizó añadiendo al medio 5 mM de EGTA y 2 mM de Tris inmediatamente antes de la adición de los AIGa (indicado con una flecha). Experimento representativo de 6 realizados.

2.2.2.b.- Liberación del calcio de los depósitos intracelulares:

En otro tipo de experimentos se utilizó el TMB-8, un inhibidor de la salida del calcio de los orgánulos intracelulares en varios tipos de células, aunque su mecanismo de acción y su lugar exacto de actuación no se conocen claramente [223]. Las células mesangiales se incubaron durante 10 minutos con 5×10^{-5} M de TMB-8 antes de la adición de los AlgA.

La presencia de TMB-8 reduce considerablemente la intensidad del pico inducido por los agregados, pero no afecta de forma apreciable a la caída gradual posterior hasta la línea base. Cuando la estimulación se realiza en un medio sin calcio (con EGTA 5 mM) la inhibición causada por el TMB-8 es mayor y los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ descienden más rápidamente (figura 32).

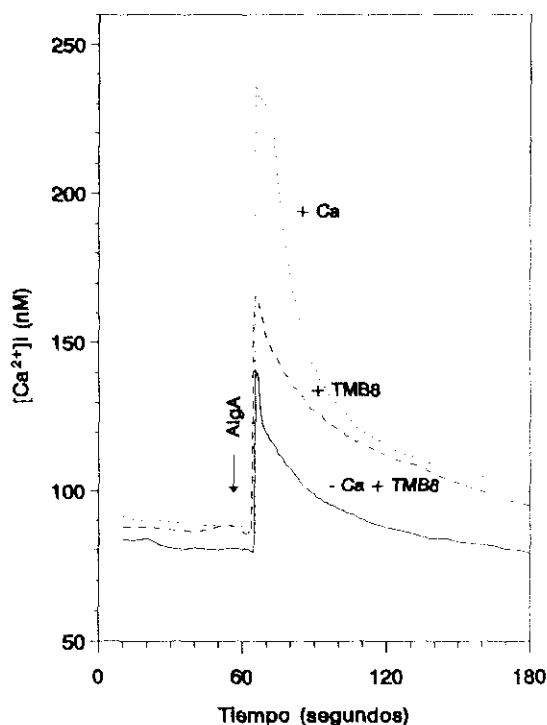


Figura 32: *Influencia del calcio intracelular en las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células mesangiales estimuladas con AlgA:* Las células se preincubaron durante 10 minutos con 5×10^{-5} M de TMB-8 antes de añadir 500 μ g/ml de AlgA, en presencia de 2 mM de calcio (+ Ca) o en ausencia (- Ca). La eliminación del calcio extracelular se realizó añadiendo al medio 5 mM de EGTA y 2 mM de Tris inmediatamente antes de la adición de los AlgA (indicado con una flecha). Experimento representativo de un total de 8 llevados a cabo.

A partir de un total de 8 experimentos realizados se obtuvo un porcentaje de inhibición para el TMB-8 del 44 ± 5 (media \pm DE, $p < 0.05$) respecto del incremento máximo determinado en ausencia del inhibidor.

2.2.2.c.- Efecto de la toxina de pertussis y de la estaurosporina:

Intentamos determinar las vías intracelulares de activación que tenían lugar en la movilización de calcio causada por los AlgA. Para ello empleamos dos tipos de inhibidores: la toxina de pertussis, un inhibidor de las proteínas G y la estaurosporina, bloqueante de la actividad de la PKC [223]. Los experimentos se realizaron de forma análoga a los anteriores, con una preincubación de 10 minutos en KHH conteniendo los inhibidores, y luego se siguieron las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células mesangiales estimuladas por los AlgA, en ausencia o presencia de EGTA 5 mM. El resumen de estas inhibiciones se refleja en la tabla VII.

La preincubación de las células mesangiales con 1 μ g/ml de toxina de pertussis no disminuye el pico de calcio producido por los AlgA, tanto en ausencia como en presencia de calcio extracelular en el medio de incubación, pues los porcentajes de inhibición no superan el 15 % (no significativo respecto del control).

Cuando las células mesangiales se preincuban con 5×10^{-8} M de estaurosporina, el aumento máximo producido por los AlgA disminuye parcialmente, tanto en presencia (32 % de inhibición) como en ausencia de calcio extracelular (37 %). Este efecto inhibitorio es más acusado cuando se observa el descenso gradual de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta la línea base (resultado no mostrado).

TABLA VII

Inhibiciones del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en las células mesangiales estimuladas con AlGA

	% inhibición	
	+ Ca	- Ca
Toxina de pertussis	11 ± 6 (n.s)	14 ± 4 (n.s)
Estaurosporina	32 ± 10 (*)	37 ± 7 (*)

Las células se preincubaron durante 10 minutos con toxina de pertussis (1 μ g/ml) o estaurosporina (5×10^{-8} M) antes de añadir 200 μ g/ml de AlGA, en presencia de 2 mM de calcio (+ Ca) o en ausencia (- Ca). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición respecto del incremento producido por los AlGA en ausencia de inhibidores y son la media \pm DE de un total de 3-5 experimentos diferentes. Los símbolos entre paréntesis indican el análisis estadístico respecto de los controles: n.s., no significativo; *, $p < 0.05$.

A la vista de los resultados comentados en los apartados anteriores podemos decir que los AlGA producen en las células mesangiales un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$. Dicho aumento puede ser debido inicialmente a la movilización del calcio de las reservas intracelulares y, en segundo término, al incremento del influjo de calcio extracelular a través de la membrana plasmática de las células. Además, la movilización del calcio en el interior de la célula mesangial no es una señal dependiente de proteínas Gi, pero sí parece estar asociada, en parte, a la activación de la PKC.

2.3.- PRODUCCION DE CITOCINAS POR LAS CELULAS MESANGIALES

2.3.1- Producción de $\text{TNF}\alpha$:

2.3.1.a.- Medida de la actividad biológica del $\text{TNF}\alpha$:

La actividad biológica contenida en los sobrenadantes de las células mesangiales se determinó mediante el ensayo citotóxico de las células L929 [197]. Inicialmente se estudió la producción de $\text{TNF}\alpha$ por las células mesangiales de rata a lo largo del tiempo, tanto en condiciones basales como en presencia de un estímulo positivo, el LPS. Los resultados de la figura 33 indican una máxima producción de $\text{TNF}\alpha$ cuando las células mesangiales se incuban durante 6 horas con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS. La medida de $\text{TNF}\alpha$ en condiciones basales es de 8.5 ± 1 U/mg proteína (media \pm EE), y en presencia de LPS es de 1016 ± 118 U/mg proteínas celulares en cada pocillo (determinado por Lowry).

La producción de $\text{TNF}\alpha$ por las células mesangiales inducida por LPS disminuye de forma significativa en presencia de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas (figura 33), lo que indica que es necesaria la síntesis *de novo* de la citocina.

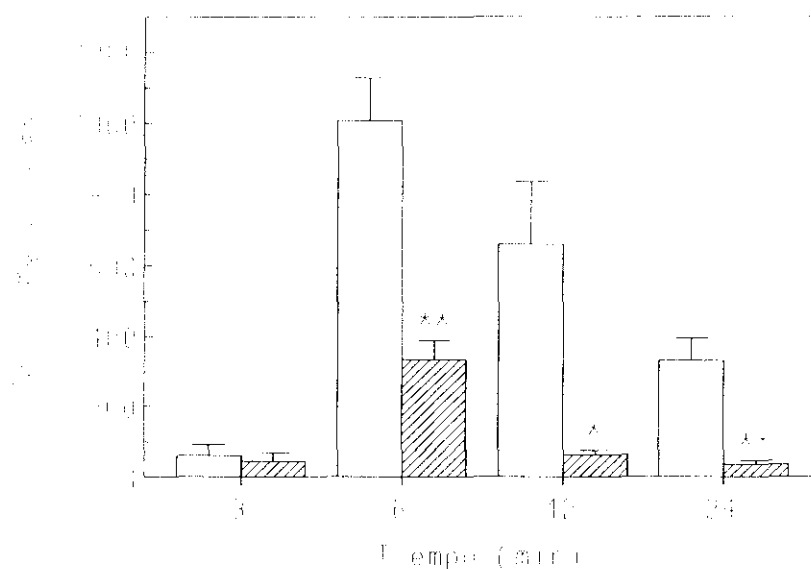


Figura 33: Producción de $TNF\alpha$ por las células mesangiales estimuladas con LPS: Las células se incubaron a 37°C con 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS en RPMI-HEPES con 0.5% de STF, en ausencia (\square) o en presencia (\square) de 1 $\mu\text{g/ml}$ de CHX. La actividad de $TNF\alpha$ de los sobrenadantes se determinó mediante ensayo citolítico sobre las células L929. Los datos se expresan en unidades de $TNF\alpha$, corregidos según la cantidad de proteínas totales contenida en cada pocillo y en ellos están restados los valores basales de las células mesangiales sin estimular. Media \pm EE de 6-10 experimentos. El análisis estadístico se indica como *, $p < 0.05$ y **, $p < 0.005$ para CHX frente a LPS.

A la vista de los resultados obtenidos con LPS, seleccionamos el tiempo de 6 horas y estudiamos la producción de $TNF\alpha$ por las células mesangiales de rata estimuladas con diferentes concentraciones de IgA e IgG (en forma monomérica o agregadas por calor). En la figura 34 se observa que dicha producción es dependiente de la dosis, con tendencia a la saturación entre 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$ de agregados. La máxima cantidad de $TNF\alpha$ inducida por 300 $\mu\text{g/ml}$ de los A IgA y de A IgG es de 719 ± 100 y 592 ± 111 U/mg de proteína celular (media \pm EE), respectivamente. Estos valores representan un 71% y un 59% respecto de la producción debida al LPS en el mismo tiempo.

Por otro lado, la liberación de $TNF\alpha$ provocada por las proteínas en estado monomérico es significativamente menor que la inducida por los agregados. El aumento en

el $\text{TNF}\alpha$ que IgA e IgG provocan en las células mesangiales representa un 20% y un 10%, respectivamente, del máximo detectado en presencia de LPS al mismo tiempo de incubación.

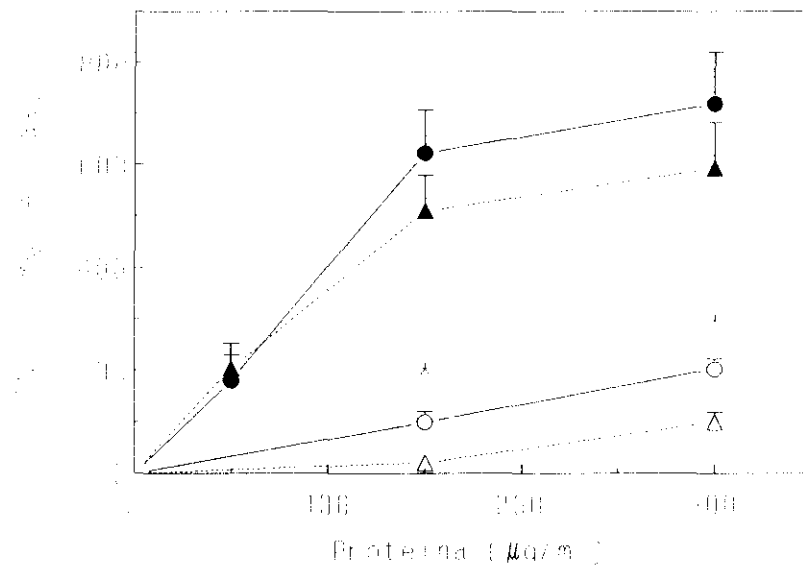


Figura 34: Producción de $\text{TNF}\alpha$ por células mesangiales de rata estimuladas con IgA e IgG: Las células se incubaron durante 6 horas a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de AlGA (●), IgA monomérica (○), AlGG (▲) o IgG monomérica (Δ). La actividad en los sobrenadantes se midió con el ensayo de las células L929, expresándose los resultados en unidades de $\text{TNF}\alpha$ por mg de proteína en cada pocillo, restando el valor basal de células mesangiales sin estimular. Media \pm EE de 10 experimentos diferentes. Los símbolos indican el análisis estadístico de los valores obtenidos con las proteínas monoméricas respecto de las agregadas: *, $p < 0.001$.

En otros experimentos seleccionamos la dosis de $150 \mu\text{g/ml}$ para seguir la producción de $\text{TNF}\alpha$ por las células mesangiales a lo largo del tiempo. Como se muestra en la figura 35, tanto los AlGA como los AlGG inducen una liberación de $\text{TNF}\alpha$ dependiente del tiempo. El pico de máxima liberación se detecta a las 6 horas de incubación a 37°C ; a partir de este punto comienza a descender el $\text{TNF}\alpha$ liberado, para alcanzar valores próximos a los niveles basales a las 24 horas de incubación.

En la mayoría de los casos estudiados, tanto en la curva de dosis como en la de tiempo, la IgA induce una mayor producción de $\text{TNF}\alpha$ que la IgG. Por ejemplo, después de 12 horas de incubación, la producción de $\text{TNF}\alpha$ correspondiente a los AlG es de 441 ± 119 U/mg proteína, mientras que la debida a los AlGA es de 551 ± 45 . Sin embargo, estas diferencias no llegan a ser significativas en ninguno de los tiempos estudiados.

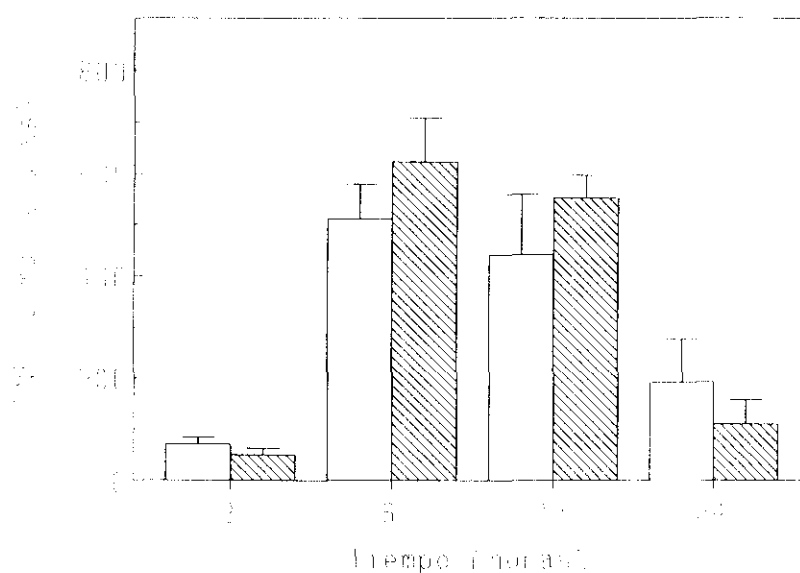


Figura 35: Medida del $\text{TNF}\alpha$ producido por las células mesangiales estimuladas con agregados:

Las células se incubaron con $150 \mu\text{g/ml}$ de AlG (\square) o AlGA (\boxtimes) en RPMI-HEPES con 0.5% de STF. A los tiempos indicados se recogieron los sobrenadantes libres de células y se determinó la actividad de $\text{TNF}\alpha$ que contenían. Los datos son la media \pm EE de 8 experimentos y se expresan en unidades de $\text{TNF}\alpha$ por mg de proteína total en cada pocillo. Para cada tiempo, se restaron los valores basales de células mesangiales sin estimular. Las diferencias respecto del basal son significativas en todos los tiempos ($p < 0.05$).

También investigamos el efecto del inhibidor de la síntesis proteica, CHX, sobre la producción de $\text{TNF}\alpha$ por las células mesangiales estimuladas con AlgA y AlgG. Los resultados se resumen en la tabla VIII, demostrando que la síntesis *de novo* de la citocina es un requisito para su liberación al medio extracelular.

TABLA VIII
Efecto de la CHX sobre la producción de $\text{TNF}\alpha$
por las células mesangiales estimuladas con agregados

Estímulo	6 horas	12 horas
Basal	9 \pm 1	19 \pm 1
Basal + CHX	3 \pm 0.1 (67%)*	4 \pm 0.5 (79%)*
AlgG	516 \pm 34	457 \pm 114
AlgG + CHX	167 \pm 14 (67%)**	122 \pm 47 (73%)*
AlgA	625 \pm 46	554 \pm 17
AlgA + CHX	154 \pm 23 (75%)**	67 \pm 7 (88%)**

Las células mesangiales de rata (en condiciones basales o estimuladas con 150 $\mu\text{g/ml}$ de AlgG o AlgA) se incubaron en ausencia o en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de CHX. Los resultados se expresan en unidades de $\text{TNF}\alpha$ por mg de proteínas totales, como media \pm EE, o en porcentaje de inhibición (indicando entre paréntesis) causado por la CHX respecto del control. Datos obtenidos a partir de 4 experimentos realizados por duplicado. Los símbolos indican la significación con respecto al control: *, $p < 0.05$ y **, $p < 0.001$.

2.3.1.b. - Especificidad del $\text{TNF}\alpha$:

Es necesario descartar la posibilidad de que la producción de $\text{TNF}\alpha$ sea debida a una posible contaminación de los estímulos con endotoxina. Por ello, se realizaron estudios en presencia o ausencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de polimixina B. Según los resultados de la tabla IX, no se aprecia ningún descenso significativo de la liberación de $\text{TNF}\alpha$ por las células mesangiales cuando la polimixina B está en el medio de incubación, lo que excluye que las preparaciones de IgA e IgG (monoméricas o agregadas por calor) contengan cantidades apreciables de endotoxina bacteriana.

También se investigó si los anticuerpos anti- $\text{TNF}\alpha$ eran capaces de bloquear la actividad citolítica del $\text{TNF}\alpha$ liberado por las células mesangiales. Efectivamente, la neutralización de las muestras con 1 μg de anticuerpo policlonal anti- $\text{TNF}\alpha$ es prácticamente completa, como puede apreciarse en la tabla IX.

TABLA IX
Especificidad del $\text{TNF}\alpha$ producido por las células mesangiales

	Polimixina B (n.s.)	anti-$\text{TNF}\alpha$ ($p < 0.001$)
Basal	5.8 ± 0.3	100
LPS 1 $\mu\text{g/ml}$	n.d.	77 ± 7
AlgA 150 $\mu\text{g/ml}$	6.7 ± 0.9	92 ± 9
300 $\mu\text{g/ml}$	8.5 ± 0.9	74 ± 13
AIgG 150 $\mu\text{g/ml}$	4.5 ± 0.2	89 ± 5
300 $\mu\text{g/ml}$	9.5 ± 1.1	75 ± 11

Las células mesangiales se incubaron durante 12 horas con los diferentes estímulos en presencia o ausencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de polimixina B. En otros experimentos, las muestras se neutralizaron por incubación con 1 μg de anticuerpo policlonal anti- $\text{TNF}\alpha$. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición respecto del control (en ausencia de polimixina B o de anti- $\text{TNF}\alpha$) y son la media \pm DE de 3-5 experimentos. La significación estadística respecto del control se indica en la parte superior, al lado de cada inhibidor.

En algunos casos, como control interno del experimento, se realizaron incubaciones de las células L929 en presencia de los estímulos utilizados en nuestro estudio (IgA e IgG). Se obtuvieron los mismos valores de absorbancia en los pocillos de células L929 incubadas con agregados que en los pocillos control, con medio de cultivo solamente (resultados no mostrados), lo que demuestra que los agregados por sí mismos no son citotóxicos para las células L929.

2.3.1.c.- Expresión del mRNA del TNF α :

Los resultados obtenidos por medida de citotoxicidad se confirman cuando realizamos análisis de Northern blot con la sonda del TNF α . Las células mesangiales se incubaron durante 4 horas en medio de cultivo RPMI-HEPES con 0.5 % de STF, en presencia de LPS (1 μ g/ml) o de IgA, AlgA o AIgG (150 μ g/ml). Después de extraer el RNA total y analizarlo por electroforesis, se hibridó con la sonda del TNF α marcada con 32 P (figura 36). El análisis densitométrico de las bandas (corrigiendo según la expresión del RNA ribosomal 28S) indica que los AlgA inducen un aumento en la expresión del mRNA del TNF α de aproximadamente 4 veces respecto del basal; los AIgG aumentan los niveles en 3.2 veces. La IgA monomérica ejerce un efecto estimulador más débil (1.8 veces el basal). La presencia de LPS como control positivo de la estimulación incrementa la expresión de TNF α 6 veces.

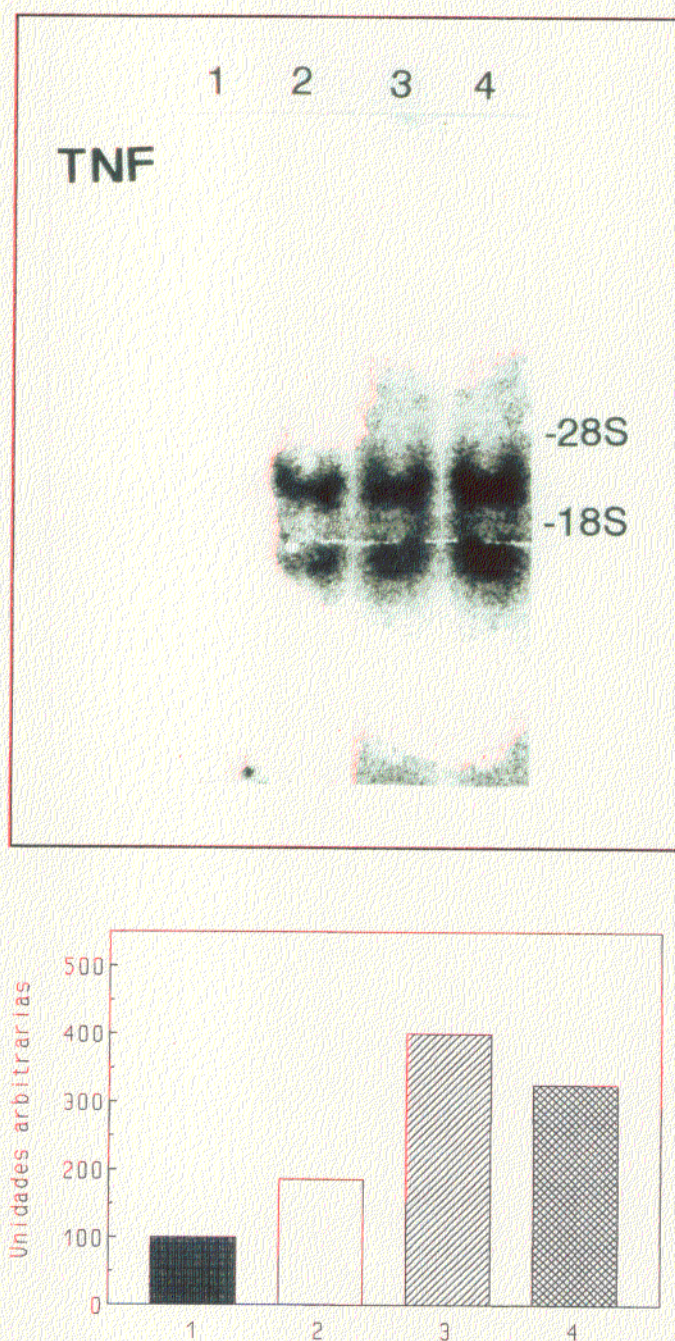


Figura 36: *Expresión del mRNA del TNF α en células mesangiales de rata:* Las células mesangiales se incubaron durante 4 horas en medio de cultivo en condiciones basales (carril 1) o bajo estimulación con 150 $\mu\text{g/ml}$ de IgA monomérica (carril 2), A1gA (carril 3) o A1gG (carril 4). El RNA total celular se extrajo y se sometió a electroforesis y transferencia. La hibridación se realizó con la sonda del TNF α marcada radiactivamente. La parte superior muestra la autorradiografía de uno de los geles, indicando las posiciones de los RNA ribosomales, 28S y 18S. En la parte inferior aparece el resultado de la cuantificación de las bandas por densitometrado, corregido por la expresión del RNA del 28S. Los datos se expresan en unidades arbitrarias de densitometrado, como porcentaje respecto del basal y constituyen un experimento representativo de 2 realizados.

2.3.2.- Producción de IL-6:

2.3.2.a.- Medida de la actividad biológica de la IL-6:

Las medidas de IL-6 se realizaron mediante el bioensayo de proliferación de las células B9 [198]. En un primer abordaje estudiamos la respuesta de las células mesangiales frente a un estímulo positivo, como es el LPS. La máxima producción se detecta después de 12 horas de incubación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (1413 ± 60 U/mg), mientras que los valores de control son de 99 ± 3 U/mg. Al igual que en el caso del $\text{TNF}\alpha$, es necesaria la síntesis *de novo* de la IL-6, ya que la presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de CHX en el medio de incubación disminuye de forma bastante apreciable la producción de dicha citocina (figura 37).

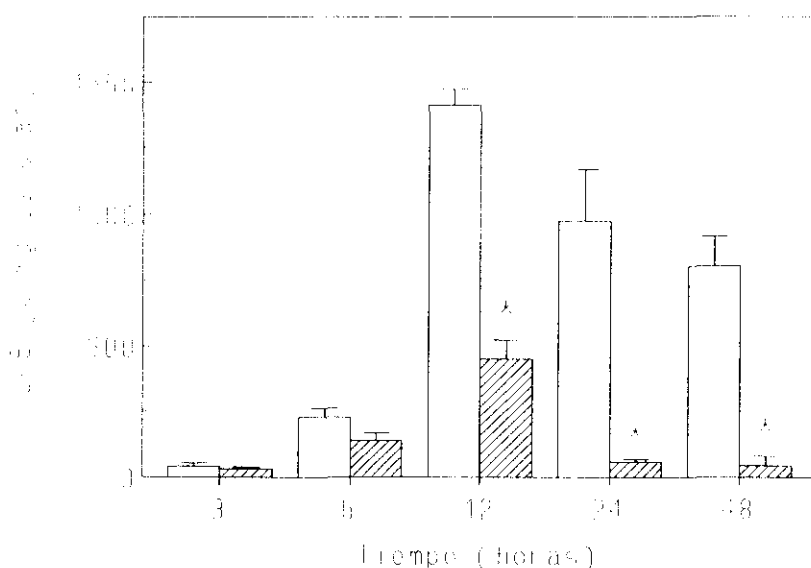


Figura 37: Producción de IL-6 por las células mesangiales de rata estimuladas con LPS: Las células mesangiales de rata se incubaron durante diferentes intervalos de tiempo con 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, en ausencia (□) o en presencia (▨) de 1 $\mu\text{g/ml}$ de CHX. La actividad en los sobrenadantes se midió con el ensayo de las células B9. Los resultados se expresan en unidades de IL-6 por mg de proteína en cada pocillo, restando en cada tiempo el valor basal de células mesangiales sin estimular. Media \pm EE de 5-7 experimentos. Significación de la CHX respecto del LPS: *, $p < 0.005$.

Seleccionamos el tiempo de 12 horas para detectar la estimulación de las células mesangiales con diferentes concentraciones de IgA (monomérica o agregada por calor). La figura 38 muestra un aumento de la producción de IL-6 en función de la concentración de IgA. La máxima estimulación se detecta con 300 $\mu\text{g/ml}$ de AIgA, obteniéndose un valor de 450 ± 73 U/mg proteína celular, lo que representa aproximadamente un 32 % de lo inducido por el LPS.

En la figura 38 también se observa que, en las tres concentraciones estudiadas, los valores de IL-6 obtenidos con los AIgA son significativamente mayores que los obtenidos con IgA monomérica. El máximo de producción de IL-6 con la proteína monomérica se obtiene con 300 $\mu\text{g/ml}$ (149 ± 12 U/mg proteína), lo que representa aproximadamente un 11 % de la producción medida en presencia de LPS.

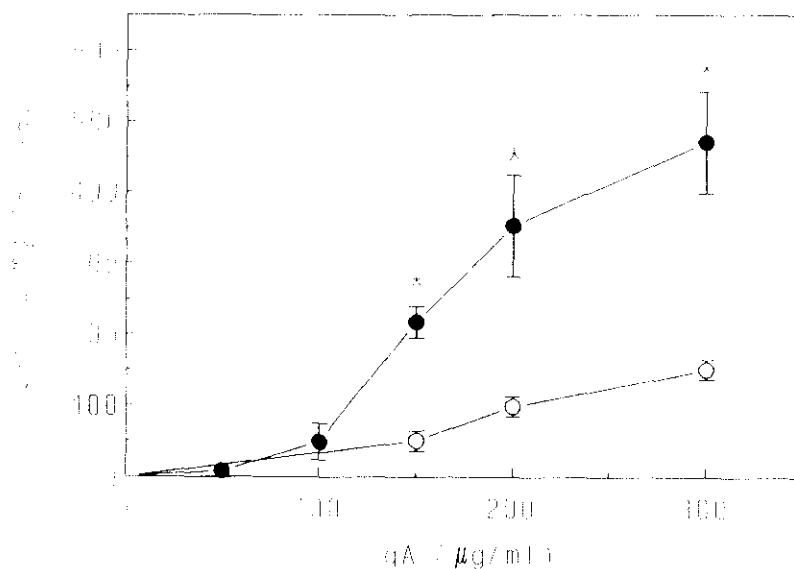


Figura 38: Síntesis de IL-6 por las células mesangiales de rata en cultivo estimuladas con IgA: Las células se incubaron con diferentes concentraciones de AIgA (●) o IgA monomérica (○) durante 12 horas a 37°C. La actividad de IL-6 en los sobrenadantes se midió por proliferación de las células B9, expresándose los resultados en unidades de IL-6 por mg de proteína en cada pocillo (determinado por Lowry). En cada tiempo se tuvo en cuenta el valor basal de células mesangiales sin estimular. Media \pm EE de 8 experimentos diferentes realizados por duplicado. Los símbolos indican el análisis estadístico de la producción de las proteínas monoméricas respecto de las agregadas: *, $p < 0.005$.

En otros experimentos realizamos una curva de síntesis de IL-6 en función del tiempo, utilizando como estímulos los AlG y AlGA. Después de 6 horas se detecta una cantidad considerable de IL-6 en el medio, alcanzándose el valor máximo a las 12 horas de incubación. A partir de este tiempo se produce un descenso gradual de la síntesis de IL-6 por las células, pero de forma lenta, pues incluso a las 48 horas se mantienen todavía los niveles elevados de esta citocina en los sobrenadantes de las células mesangiales estimuladas con los agregados (figura 39).

Comparando la capacidad de estimulación de las células mesangiales por parte de los dos tipos de agregados, los mayores valores de IL-6 se observan con los AlG, aunque las diferencias no llegan a ser significativas (figura 39).

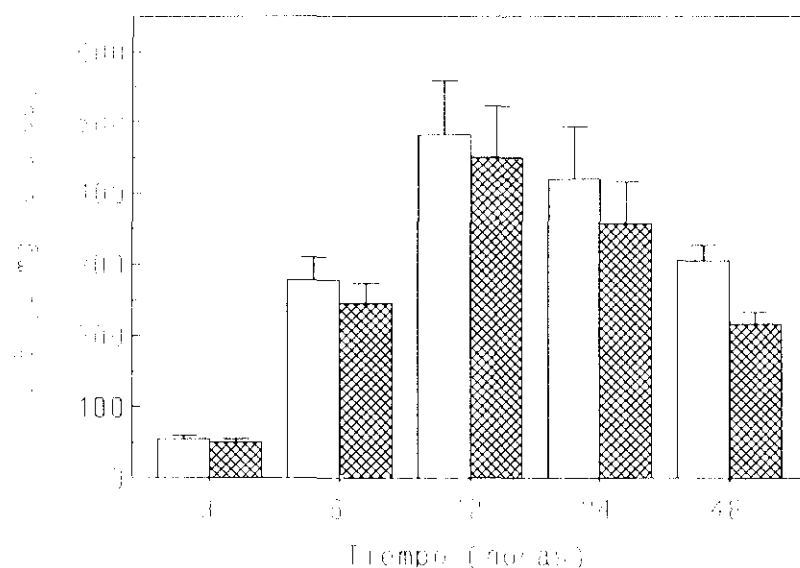


Figura 39: *Síntesis de IL-6 por las células mesangiales de rata estimuladas con agregados:* Las incubaciones se realizaron a 37°C en presencia de 300 µg/ml de AlG (□) o AlGA (▨). Finalizados los tiempos indicados se determinó en el sobrenadante la actividad de IL-6, expresada en unidades por mg de proteínas en cada pocillo. Los valores son la media ± EE de 9 experimentos diferentes realizados por duplicado. Las diferencias respecto del basal son significativas en todos los tiempos ($p < 0.05$).

Determinamos también la cinética de la síntesis de IL-6 por las células mesangiales de rata estimuladas con AdesIgA. Como se muestra en la figura 40, a partir de 6 horas las células sintetizan una cantidad apreciable de IL-6, que es máxima después de 12 horas de incubación con los AdesIgA. La producción va descendiendo gradualmente hasta las 48 horas, pero no llega a alcanzar los niveles basales.

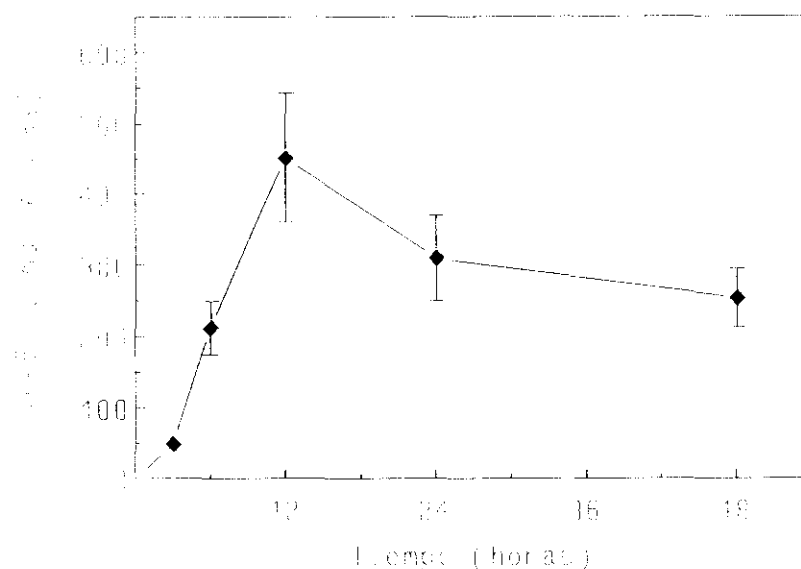


Figura 40: *Producción de IL-6 por las células mesangiales estimuladas con AdesIgA:* Las células se incubaron durante diferentes intervalos de tiempo con 300 $\mu\text{g/ml}$ de AdesIgA y se determinó la bioactividad de la IL-6 en los sobrenadantes, restando en cada punto la producción basal. Los resultados, en unidades por mg de proteína en cada pocillo, son la media \pm EE de 4 experimentos. A todos los tiempos las diferencias respecto del basal son significativas ($p < 0.05$).

En la tabla X se resumen los resultados obtenidos cuando se utilizó el inhibidor de la síntesis proteica CHX. Tras 6 horas de incubación, los porcentajes de descenso calculados están comprendidos entre un 60% y un 70%, mientras que a las 12 horas puede alcanzarse hasta un 80% de inhibición. Estos datos sugieren que la producción de IL-6 a lo largo del tiempo por las células mesangiales requiere la síntesis *de novo* de la citocina.

TABLA X
Efecto de la CHX sobre la IL-6 producida por las células mesangiales

Estímulo	6 horas	12 horas
Basal	42 ± 12	99 ± 3
Basal + CHX	15 ± 5 (64%)*	33 ± 3 (67%)**
AIgG	343 ± 33	523 ± 77
AIgG + CHX	101 ± 84 (71%)**	97 ± 4 (81%)**
AIgA	311 ± 28	492 ± 73
AIgA + CHX	106 ± 9 (66%)**	103 ± 5 (79%)**
AdesIgA	278 ± 37	493 ± 92
AdesIgA + CHX	86 ± 7 (69%)**	95 ± 8 (81%)**

Las células se incubaron con las diferentes proteínas, en ausencia o en presencia de 1 µg/ml de CHX. Los resultados se expresan en unidades de IL-6 por mg de proteínas totales (media ± EE) o en porcentaje de inhibición (entre paréntesis) causado por la CHX respecto del control. Datos obtenidos a partir de 4 experimentos diferentes realizados por duplicado. Los símbolos indican la significación con respecto al control: *, $p < 0.05$ y **, $p < 0.001$.

Las células mesangiales de origen humano también presentan capacidad de sintetizar IL-6 cuando se estimulan con AIgA o AIgG. Los valores de IL-6 determinados por bioensayo son superiores a los obtenidos en las células de rata, tanto en condiciones basales como después de ser estimuladas con dos dosis diferentes de los agregados (figura 41). La dosis de 150 µg/ml de AIgG es mucho más efectiva que la de AIgA, mientras que a 300 µg/ml ambos agregados inducen una cantidad similar de IL-6.

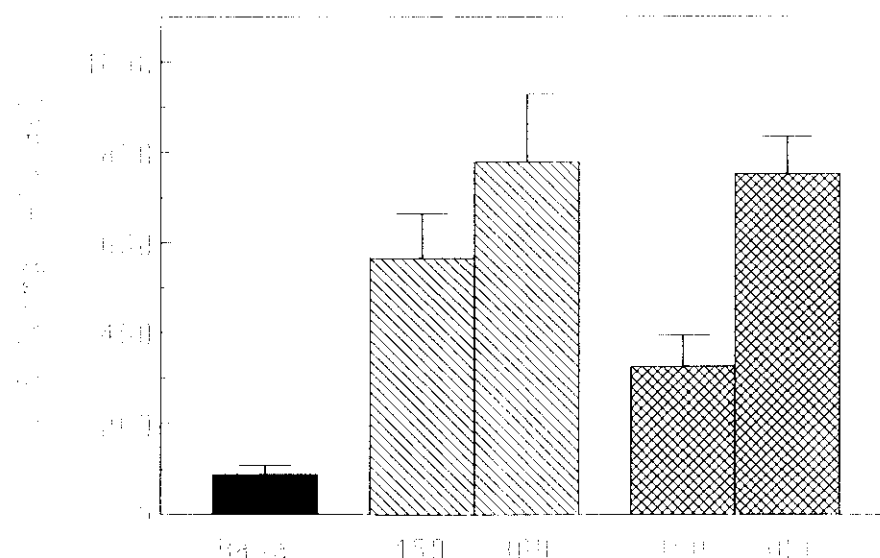


Figura 41: Producción de IL-6 por las células mesangiales humanas: Las células se incubaron en condiciones basales (RPMI-HEPES con 0.5% STF) (■) o con diferentes concentraciones (indicado en la gráfica en µg/ml) de AlgG (▨) o AlgA (▩) durante 12 horas a 37°C. Los resultados se expresan en unidades de IL-6 por mg de proteína en cada pocillo (determinado por Lowry) y son la media \pm EE de 3 experimentos realizados por duplicado.

2.3.2.b.- Especificidad de la IL-6:

La tabla XI resume las inhibiciones obtenidas en presencia de polimixina B (1 µg/ml) y del anticuerpo policlonal anti-IL-6. Queda descartada la existencia de endotoxina contenida en los estímulos como la responsable de los niveles elevados de IL-6 producidos por las células mesangiales, pues los porcentajes de inhibición obtenidos con polimixina B no son significativos. De la misma forma, la actividad biológica de la IL-6 contenida en las muestras es casi totalmente suprimida en presencia de anti-IL-6, lo que demuestra que el ensayo es específico.

TABLA X
Especificidad de la IL-6 producida por las células mesangiales

	Polimixina B (n.s.)	anti-IL-6 (p < 0.001)
Basal	3.9 ± 0.5	100
LPS	n.d	80 ± 7
AIgA	6.5 ± 1.1	69 ± 11
AdesIgA	4.9 ± 0.7	78 ± 11
AIgG	7.5 ± 1.3	73 ± 8

Las células mesangiales se incubaron durante 12 horas con los diferentes estímulos en presencia o ausencia de 1 µg/ml de polimixina B. En otros experimentos, las muestras se neutralizaron por incubación con 1 µg de anticuerpo policlonal anti-IL-6. Los resultados en ambos casos se expresan como porcentaje de inhibición respecto del control (en ausencia de polimixina B o de anti-IL-6) y son la media ± DE de 4 experimentos. La significación respecto al control se indica en la parte superior, al lado de cada inhibidor.

2.3.2.c.- Expresión del mRNA de la IL-6:

La expresión del mRNA de la IL-6 se estudió en células mesangiales estimuladas durante 6 horas en medio de cultivo sólo o conteniendo 10 µg/ml de LPS, 300 µg/ml de AIgG o 300 µg/ml de AIgA. Un experimento representativo se muestra en la figura 42, así como el análisis densitométrico de las bandas, corregido por la expresión total del RNA ribosómico 28S. La presencia de LPS en el medio de incubación indujo un incremento de 8 veces en la expresión del mRNA de la IL-6. En cuanto a los agregados, el aumento de la intensidad de la banda detectado fue de aproximadamente unas 4-5 veces.

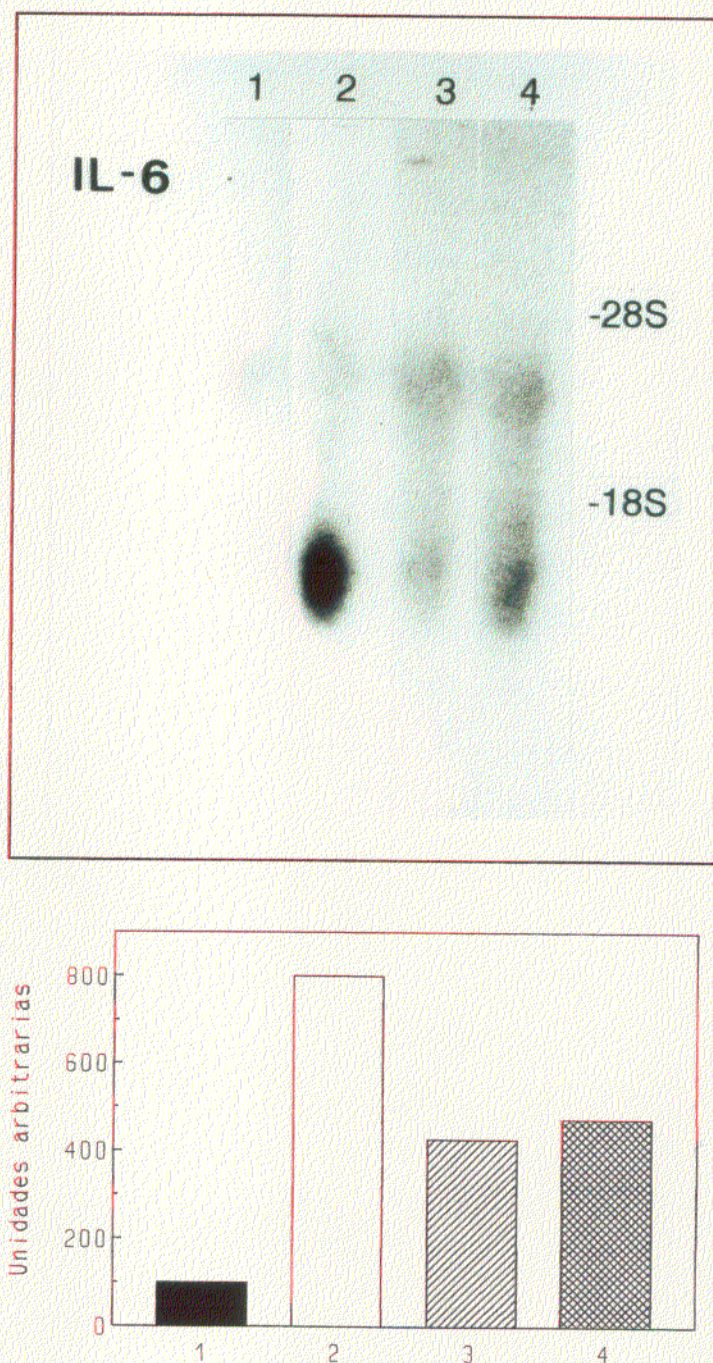


Figura 42: Expresión del mRNA de la IL-6 en células mesangiales de rata: Las células se incubaron durante 6 horas en medio de cultivo en condiciones basales (carril 1) o bajo estimulación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (carril 2) o 300 $\mu\text{g/ml}$ de AIgG (carril 3) o AIgA (carril 4). El RNA total celular se extrajo y se sometió a electroforesis y transferencia. La hibridación se realizó con la sonda de la IL-6 marcada radiactivamente. La parte superior muestra la autorradiografía de uno de los geles, indicando las posiciones de los RNA ribosomales, 28S y 18S. En la parte inferior aparece el resultado de la cuantificación de las bandas por densitometrado, corregido por la expresión del RNA del 28S. Los datos se expresan en unidades arbitrarias, como porcentaje respecto del basal y constituyen un experimento representativo de 2 realizados.

2.4.- PROLIFERACION DE LAS CELULAS MESANGIALES:

Algunos estudios *in vivo* han demostrado que en las glomerulonefritis por inmunocomplejos se producen dos fenómenos asociados: proliferación de células mesangiales y aumento en la producción de proteínas de matriz [107-109]. En este apartado estudiaremos *in vitro* el primer aspecto mencionado, es decir, si en nuestras condiciones de cultivo, las células mesangiales son capaces de proliferar en presencia de los agregados.

2.4.1.- Medida de la proliferación por incorporación de [³H]timidina:

El grado de proliferación de las células mesangiales en estado quiescente se midió en función de la cantidad de radiactividad ([³H]timidina) que eran capaces de incorporar en el DNA durante el proceso de duplicación. Cuando las células mesangiales de rata se incubaron durante 24 horas en presencia de diferentes concentraciones de AlGA, se produjo un incremento significativo de la radiactividad contenida en las células respecto del control (figura 43). Este efecto se observa incluso a bajas concentraciones de AlGA, alcanzándose el máximo a 100 µg/ml (73% de incremento respecto del control). En el caso de los AlGG se observa un incremento continuo hasta la dosis de 150 µg/ml (69% respecto del control). Cuando se emplean concentraciones más elevadas de las ya mencionadas la cantidad de timidina incorporada a las células descende suavemente. Por otro lado, las proteínas monoméricas son débiles promotores de la proliferación de las células mesangiales; con 100 µg/ml de IgA monomérica se observa un 15% de aumento respecto del basal.

En estos experimentos se utilizó como control positivo medio de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de STF. La capacidad de proliferación de las células mesangiales en presencia de STF es muy superior a la obtenida con los agregados. Por ejemplo, en presencia de 10% de STF, las células mesangiales incorporan 12311 ± 629 dpm (media \pm EE), lo que representa un 137% de aumento de la proliferación respecto del basal.

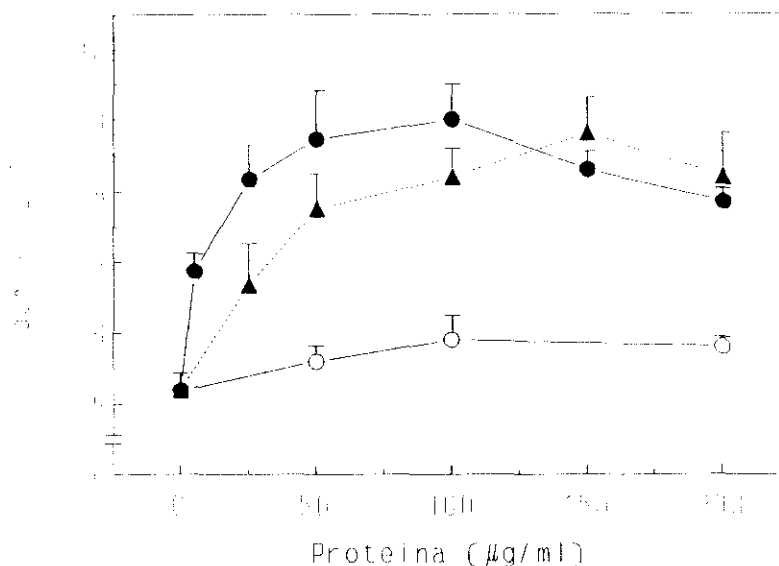


Figura 43: Proliferación de las células mesangiales de rata en presencia de IgA e IgG. El ensayo de proliferación se realizó por medida de la $[^3\text{H}]$ timidina incorporada en las células después de 24 horas de incubación a 37°C en RPMI con 0.5% de STF, en presencia de diferentes concentraciones de AlGA (●), IgA monomérica (○) o AlGG (▲). Los datos se expresan en dpm medidas en cada pocillo (placas de 96) y son la media \pm EE de 6 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias respecto del basal fueron significativas, con valores de $p < 0.05$.

Las células mesangiales de origen humano también proliferan en presencia de los agregados. En la figura 44 se muestra un ensayo de proliferación a 24 horas, indicando la radiactividad retenida en las células como porcentaje respecto del basal, considerado como 100% (3129 ± 208 dpm). La presencia de $100 \mu\text{g/ml}$ de AlGA y de AlGG en el medio produce un incremento en la proliferación de las células mesangiales del 187% y del 169%, respectivamente. Como estímulo positivo se utiliza STF al 20%, que induce un incremento de 360%.

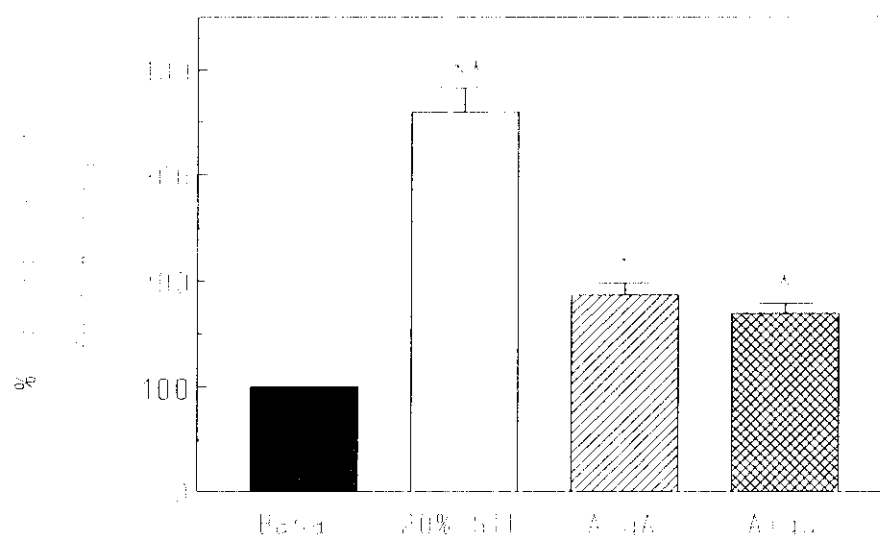


Figura 44: Proliferación de las células mesangiales humanas: Las células se incubaron durante 24 horas en placas de 96 pocillos en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de AlgA o AlgG en RPMI con 0.5% de STF, utilizando como control positivo 20% de STF. La proliferación se midió por incorporación de timidina en las células, expresando los resultados como porcentaje respecto del basal. Media \pm DE de 3 experimentos diferentes realizados por triplicado. Los símbolos indican el análisis estadístico de las diferencias respecto al basal: *, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$.

2.4.2.- Medida de la proliferación por captación de azul de metileno:

Las células mesangiales de rata se incubaron durante 48 horas con los diferentes estímulos en medio de cultivo con 0.5% de STF, utilizando como control positivo STF al 10%. Después de teñir las células vivas con el colorante azul de metileno, se determinó la absorbancia en cada pocillo, lo que nos permitió calcular el grado de proliferación. En la figura 45 se muestran los resultados obtenidos al incubar las células mesangiales con diferentes concentraciones de AlgA o AlgG. Se observa un aumento continuo en el porcentaje de proliferación respecto del basal en presencia de concentraciones crecientes de los agregados. El máximo efecto se alcanza entre 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteína (alrededor del 25% respecto del basal) y a partir de este punto se detecta un descenso en el porcentaje

calculado. Estos resultados obtenidos mediante incorporación de azul de metileno son relativamente bajos, pero las diferencias respecto del basal son estadísticamente significativas. En presencia del control positivo del experimento (medio de cultivo con 10% de STF) el grado de proliferación de las células mesangiales aumentó hasta un porcentaje de 76 ± 27 (media \pm DE).

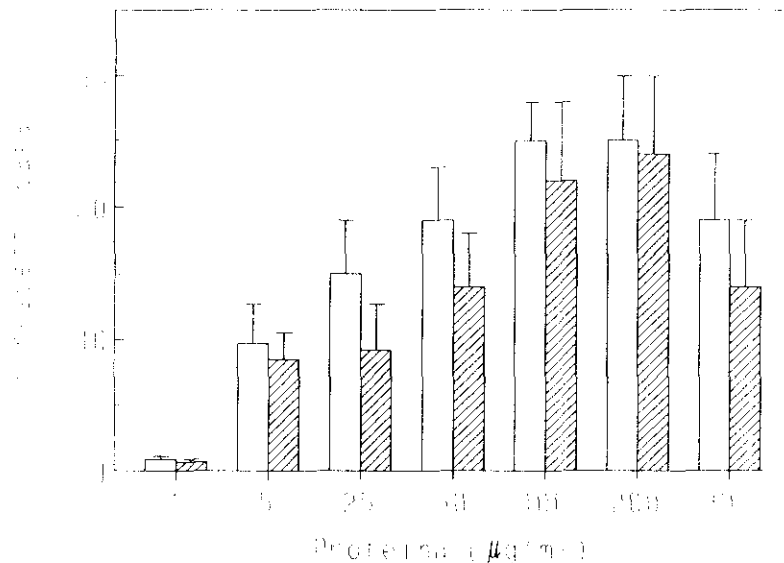


Figura 45: Medida de la proliferación de las células mesangiales de rata por captación de azul de metileno: Las células se incubaron durante 48 horas en placas de 96 pocillos en presencia de varias concentraciones de AlGA (□) o AlGg (▨). Las células se tificaron con azul de metileno y se midió la absorbancia de cada pocillo. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del basal y son la media \pm DE de 6 experimentos realizados por triplicado. La significación respecto del basal es de $p < 0.05$ para todas las dosis, excepto para 1 µg/ml de agregados (n.s.).

2.4.3.- Factores implicados en la proliferación de las células mesangiales:

Quisimos precisar si la proliferación de las células mesangiales de rata inducida por los agregados era un efecto directo de los mismos, o estaba mediado por otras moléculas, por ejemplo, algunas citocinas. Para ello, realizamos estudios de captación de [^3H]timidina durante 24 horas con una dosis de agregados (100 $\mu\text{g/ml}$) en presencia de tres anticuerpos policlonales anti-citocinas: anti-TNF α , anti-IL-1 y anti-IL-6. En la elección de la dosis de anticuerpo se tuvieron en cuenta dos factores: que la concentración utilizada fuera la mínima, para que no interfiriera en el ensayo de proliferación (ya que sabemos que la IgG monomérica induce cierta proliferación) pero que fuera una dosis con capacidad neutralizante óptima (determinada en los bioensayos de medida de la actividad de cada citocina).

Como se observa en la figura 46, los tres anticuerpos neutralizan de forma significativa la proliferación inducida por los agregados. Los menores porcentajes de inhibición se consiguen con el anticuerpo anti-TNF α (un 30% con los AlGA y un 23% con los AlGG). La presencia de anti-IL-6 en el medio provoca un descenso del 56% para los AlGA y del 68% para los AlGG. Con el anticuerpo anti-IL-1 se obtienen porcentajes de inhibición similares. La proliferación de las células mesangiales no disminuye en presencia de una cantidad equivalente de una IgG no relacionada, lo que confirma la especificidad de los anticuerpos (resultados no mostrados).

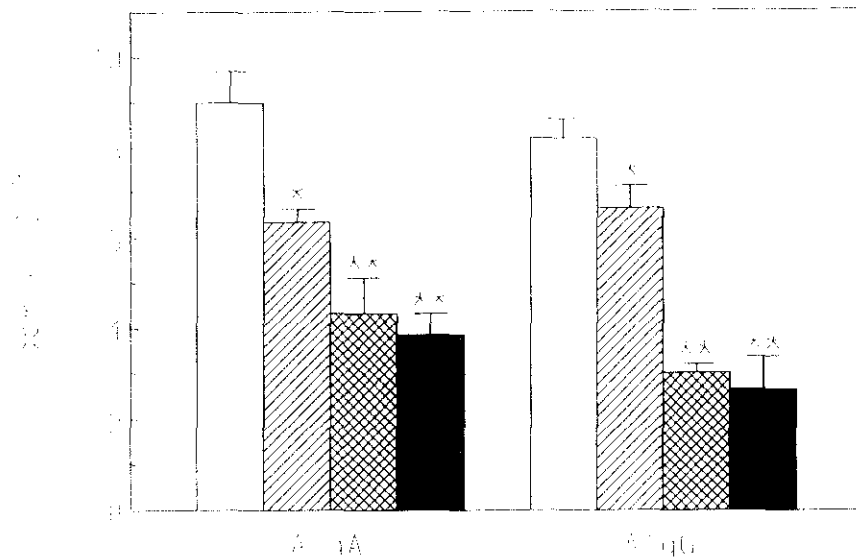


Figura 46: Efecto de los anticuerpo policlonales anti-citocinas en la proliferación de las células mesangiales inducida por los agregados: Las células mesangiales se incubaron durante 24 horas con 100 μ g/ml de AlgA o AlgG en RPMI con 0.5% de STF, en ausencia (□) o en presencia de 1 μ g de anti-TNF α (▨), anti-IL-1 (▩) o anti-IL-6 (■). La proliferación se midió por incorporación de timidina en las células. Los valores de dpm obtenidos se expresan como media \pm DE de 4 experimentos diferentes realizados por triplicado. Los símbolos indican la significación respecto al control: *, $p < 0.05$ y **, $p < 0.001$.

En experimentos adicionales realizamos incubaciones de las células mesangiales en presencia de diferentes concentraciones de IL-6, midiendo la proliferación a las 48 horas con el ensayo del azul de metileno. La absorbancia de los pocillos aumenta en función de la concentración de la citocina, alcanzándose con la dosis de 100 U/ml un porcentaje de proliferación de 46 ± 12 respecto del basal (media \pm DE de 4 experimentos, $p < 0.05$). La presencia del anticuerpo anti-IL-6 en el medio de incubación reduce totalmente el efecto proliferativo de esta citocina sobre las células mesangiales, ya que se obtuvieron porcentajes de inhibición de 87 ± 12 (media \pm DE de 4 experimentos).

A la vista de estos resultados podríamos decir que en la proliferación que inducen los AlgA y AlgG en las células mesangiales en cultivo están implicadas las citocinas TNF α , IL-1 e IL-6.

V.- DISCUSSION

El daño glomerular progresivo es la principal causa de insuficiencia renal y puede producirse como consecuencia del depósito en el glomérulo de componentes biológicamente activos, entre los que destacan los inmunocomplejos [76].

Dentro del glomérulo, el mesangio, formado por células mesangiales y matriz extracelular, no solo ocupa una posición central en la estructura, sino que mantiene un papel clave muy activo e importante en su funcionalidad, tanto en los estados normales como en los patológicos [89]. La mayoría de las células mesangiales exhiben características de músculo liso, como su capacidad de contracción, aunque también presentan aspectos similares a los macrófagos, ya que tienen capacidad de unir inmunocomplejos a través de receptores Fc, funcionar como células presentadoras de antígenos y liberar radicales de oxígeno y proteasas [77, 80-82]. Como parte de su normal función fisiológica, el mesangio participa en la regulación de la filtración glomerular y actúa en el procesamiento de los residuos macromoleculares de la filtración [89]. Cuando es perturbado por la acumulación de moléculas biológicamente activas o cuando su capacidad de procesar los residuos de la filtración se sobrepasa, el mesangio reacciona proliferando y produciendo componentes de su matriz [104].

La nefropatía IgA está incluida en el grupo de glomerulonefritis mediadas por inmunocomplejos y representa una de las enfermedades glomerulares primarias más comunes en el mundo [6, 156]. A nivel sérico está caracterizada por un aumento en la concentración de IgA polimérica y por la presencia de inmunocomplejos de IgA [167]. A nivel mesangial está caracterizada por el depósito de inmunocomplejos de IgA y, en ocasiones, de IgG y C3 [161, 165]. En los últimos años se han realizado numerosos estudios para determinar la patogenia de esta enfermedad y, aunque se sospecha que los inmunocomplejos depositados y/o formados en el mesangio participan en el daño glomerular, las evidencias acumuladas hasta el momento son escasas [170].

En este sentido, se ha demostrado que las células mesangiales poseen un receptor específico para IgG, cuyas características bioquímicas son análogas a las de los receptores Fcγ descritos en otras células macrofágicas [92, 95]. La unión y posterior endocitosis de los inmunocomplejos de IgG a través de estos receptores produce una rápida activación de las células mesangiales, que liberan diversos mediadores de la inflamación, como lípidos bioactivos, radicales libres del oxígeno y citocinas [93, 94, 98, 100, 101]. La interacción

entre las células mesangiales y los inmunocomplejos de IgA induce la liberación de ión superóxido, PAF y eicosanoides [172], pero hasta el momento no se han determinado las características bioquímicas, moleculares y funcionales de los posibles receptores para IgA en estas células.

Los resultados que se han expuesto en este trabajo demuestran que en la célula mesangial existe un receptor específico para IgA, capaz de unir esta inmunoglobulina a través de la región Fc, participando los carbohidratos contenidos en la estructura de forma determinante en dicha unión. Este receptor puede ser incluido en la familia de los receptores $Fc\alpha$, pues presenta ciertas analogías con los receptores $Fc\alpha$ descritos en otros tipos de células. Demostramos además algunos aspectos funcionales que ocurren después de la ocupación de los receptores de la membrana celular por la IgA, como los fenómenos de endocitosis y degradación de IgA y la activación de los procesos de transducción de la señal, proliferación mesangial y liberación de citocinas.

1.- CARACTERIZACION DE LA UNION DE LA IgA A LAS CELULAS MESANGIALES

1.1.- INTERACCIONES ENTRE LA IgA Y LAS CELULAS MESANGIALES

Las investigaciones realizadas en los últimos años con respecto a los receptores de inmunoglobulinas han estado enfocadas principalmente al estudio de los receptores para IgG. Así, los receptores $Fc\gamma$ están muy bien caracterizados en una gran variedad de tipos celulares, y se conocen numerosos aspectos relacionados con su estructura, modo de interacción ligando-receptor, síntesis, expresión, mecanismos de actuación y funcionalidad [37, 38]. Sin embargo, los receptores para IgA han recibido una atención relativamente escasa por parte de los investigadores.

Hasta el momento se han descrito tres tipos de receptores para IgA: receptor de inmunoglobulinas poliméricas, receptor de asialoglicoproteínas (ASG) y receptor para la región constante de la IgA ($Fc\alpha$) [8]. Los dos primeros tipos están descritos principalmente

en células hepáticas humanas y de diferentes especies animales, y están implicados en los procesos de transporte y procesamiento de macromoléculas [21, 31, 29]. Los receptores $Fc\alpha$ están presentes en la mayoría de las células del sistema hematopoyético, en hepatocitos y en algunas bacterias [8, 18, 20].

Los receptores $Fc\alpha$ están implicados en los procesos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, en la regulación de la síntesis de la IgA, en el aclaramiento de los inmunocomplejos de IgA de la circulación, en la opsonización de antígenos y en los procesos inflamatorios mediados por activación del complemento [18]. En todos estos estudios se han utilizado diferentes técnicas, como inmunofluorescencia, roseteo con eritrocitos recubiertos de IgA, inmunoprecipitación y unión de proteínas radiactivas.

Nosotros hemos estudiado la capacidad de unión de la IgA1 humana marcada radiactivamente a las células mesangiales en cultivo. Inicialmente se establecieron las **condiciones del equilibrio de unión**. A 4°C la unión de IgA a las células mesangiales es dependiente del tiempo, estabilizándose a partir de los 60 minutos. La **forma molecular** de la proteína influye en su capacidad de unión a las células, pues la IgA polimérica se une en mayor cantidad que la monomérica.

La unión de la IgA1 humana (60 minutos, 4°C) es dependiente de la dosis y se alcanza la **saturación** en el rango de concentraciones estudiado. Por **análisis de Scatchard** de la unión específica de la IgA demostramos que en las células mesangiales existe una población homogénea de sitios de unión del mismo tipo. Los cálculos indican un número aproximado de 10^5 moléculas de IgA por célula, que se unen con elevada afinidad ($K_a = 7.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$).

El valor de la constante de afinidad obtenido se encuentra en el mismo orden de magnitud que las constantes previamente descritas de la unión de IgA a otros tipos de células. En linfocitos y macrófagos alveolares existen 3.3×10^5 sitios de unión para IgA con una afinidad de $5.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [58]. En los neutrófilos humanos la afinidad del receptor $Fc\alpha$ por la IgA es de $0.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [41], superior a la que presenta el receptor $Fc\gamma$ (tipos RII y RIII) por la IgG, que es del orden de 10^7 M^{-1} , pero menor que la del $Fc\gamma$ RI [8, 43].

Las células mesangiales de rata presentan una población de 1.02×10^5 sitios de unión para inmunocomplejos de IgG de conejo, con una afinidad de 10^6 M^{-1} [93]. Sin embargo, utilizando AIG de un tamaño más homogéneo, se ha determinado un número medio de

2.7×10^5 sitios de unión por célula mesangial, cuya afinidad es de $2.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [94].

Otros investigadores han demostrado la **especificidad** del receptor de IgA en diversos tipos de células. Dichos receptores son específicos de clase, pues la unión de IgA marcada a las células no se consigue bloquear con otros tipos de inmunoglobulinas, como IgM, IgG, IgE o IgD [32, 34, 51-53, 59, 70].

En nuestro caso también hemos demostrado que la interacción entre la IgA y su receptor en células mesangiales es específica para esta clase de inmunoglobulina. Varios resultados apoyan esta idea. En primer lugar, la unión de IgA es autodesplazable, es decir, la presencia de un exceso de IgA no marcada inhibe de forma dosis-dependiente la unión de la ^{125}I -IgA. En segundo término, otras clases de inmunoglobulinas (IgG e IgM) no provocan un desplazamiento considerable de la unión, ni siquiera empleando dosis elevadas.

Para determinar de forma más concreta la **naturaleza de la unión** de la IgA a las células mesangiales se realizaron ensayos de inhibición con los fragmentos de esta inmunoglobulina. Utilizamos una proteasa liberada por las bacterias *Haemophilus influenzae*, que actúa específicamente sobre las uniones prolil-seril de la región bisagra de la IgA1, dividiendo la molécula en sus fragmentos F(ab) y Fc, sin afectar en gran medida a la configuración de dichos fragmentos ni a la composición de los carbohidratos [2]. Solamente el fragmento Fc causa una inhibición importante de la unión de la IgA a las células mesangiales. Esta capacidad selectiva de inhibición de la unión de la IgA indica que el sitio de interacción con la célula mesangial debe estar localizado en la región constante (dominios $\text{C}_{\text{H}2}$ y $\text{C}_{\text{H}3}$) de la inmunoglobulina.

En los neutrófilos humanos el dominio $\text{C}_{\text{H}2}$ de la IgA está directamente implicado en la interacción entre el receptor $\text{Fc}\alpha$ y la región constante de la inmunoglobulina [8], pero no se ha determinado cuáles son los aminoácidos de este dominio que están involucrados en la unión. Los receptores de IgG están mucho mejor caracterizados en cuanto al sitio de interacción con la IgG. Los receptores de baja afinidad $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ y RIII poseen dos sitios de unión activos: el específico para el dominio $\text{C}_{\text{H}3}$ de la IgG, directamente implicado en la interacción con el ligando, y el específico para algunos residuos del dominio $\text{C}_{\text{H}2}$, que participa en la unión y en la producción de señales de activación intracelulares [208]. El receptor $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ presenta una alta afinidad por los residuos situados en el extremo N-terminal del dominio $\text{C}_{\text{H}2}$ de la IgG y esta única interacción es capaz de desencadenar los procesos

de activación celular. La región bisagra de la inmunoglobulina también participa en la interacción, posiblemente determinando la accesibilidad del receptor Fc γ I al sitio de unión en el dominio C_H2 [209].

Diversos investigadores han demostrado la existencia de receptores Fc para inmunoglobulinas en diferentes células, utilizando tanto **sistemas heterólogos** como **homólogos**. Los monocitos humanos son capaces de unir inmunoglobulinas de diferentes especies [201] y, al contrario, las inmunoglobulinas humanas se unen con la misma afinidad a receptores Fc de diferentes orígenes [202]. Los hepatocitos y células de Kupffer de ratón presentan una afinidad similar por la IgA polimérica y monomérica, tanto de origen humano como murino [65]. La IgA humana es capaz de unirse de forma específica a linfocitos y macrófagos alveolares de conejo [58] y a macrófagos peritoneales de rata [32, 33]. Nuestros resultados también demuestran que los macrófagos peritoneales de rata pueden unir IgA en un sistema heterólogo, observando que se trata de una unión dosis dependiente y específica para esta clase de inmunoglobulina. De igual forma, los receptores para IgG caracterizados en las células mesangiales de rata son capaces de unir IgG en un sistema heterólogo, IgG de conejo [93], o en un sistema homólogo, IgG de rata [92, 94].

La mayor parte de nuestros resultados se ha realizado en un sistema heterólogo, es decir, con IgA de origen humano y células mesangiales obtenidas de riñón de rata. Sin embargo, en este trabajo también se ha demostrado la unión en un sistema homólogo, utilizando células mesangiales humanas. La unión de IgA a las células mesangiales de origen humano es análoga a la de las células mesangiales de rata y es específica, pues la presencia de un exceso de proteína no marcada inhibe considerablemente la unión de la proteína radiactiva.

1.2.- AISLAMIENTO DEL RECEPTOR PARA IgA Y EXPRESION DE mRNA EN CELULAS MESANGIALES

1.2.1.- Receptores de la membrana de las células mesangiales:

Los receptores de IgA de leucocitos y monocito/macrófagos son los mejor caracterizados molecularmente hasta el momento. En la mayor parte de los casos estas proteínas se han aislado de las membranas celulares marcadas radiativamente, utilizando técnicas de cromatografía de afinidad (con columnas de IgA-Sepharosa) o de inmunoprecipitación (por formación de complejos receptor-IgA-anticuerpo anti-IgA y posterior precipitación con proteína A unida a Sepharosa) [8].

El receptor de IgA de los neutrófilos humanos es una proteína altamente glicosilada, con un peso molecular aproximado de 50-70 kDa y específica para IgA1 e IgA2, pero no para IgG o IgM [42, 43]. El receptor de eosinófilos es similar, pero posee un peso molecular algo superior (70-100 kDa), quizás debido a su mayor contenido en carbohidratos [50]. En los macrófagos peritoneales de rata existe un receptor para IgA del tipo $Fc\alpha$, constituido por dos subunidades (de 56 y 70 kDa de peso molecular) y que puede estar en forma soluble o asociado a la membrana celular [59].

Monteiro y col. [54] aislaron el receptor $Fc\alpha$ de las membranas de monocitos, granulocitos y de células monocíticas de la línea U937, mediante técnicas de inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-IgA. En los tres tipos de células el receptor es similar, capaz de unir IgA1 e IgA2 (polimérica y monomérica) y con un gran contenido en carbohidratos. Presenta un peso molecular aproximado de 60 kDa y está constituido por dos subunidades, de 32 y 36 kDa, unidas a través de enlaces de tipo N entre los carbohidratos [44]. Hasta el momento no se ha investigado a fondo sobre la presencia de las dos isoformas para el receptor monocítico, aunque parece que éstas podrían haberse generado por "splicing" de RNA alternativo, por modificaciones postranscripcionales en el procesamiento del mRNA o por la existencia de dos genes distintos.

En nuestros experimentos se ha realizado el aislamiento de los receptores de membrana de las **células mesangiales de rata** mediante cromatografía de afinidad con Sepharosa-IgA. Los resultados obtenidos indican que se trata de una única proteína con un

peso molecular aproximado de 60 kDa, en la que no existen uniones a través de puentes disulfuro entre los dominios, pues se obtiene la misma banda cuando la electroforesis se realiza en condiciones reductoras y no reductoras. Sería necesario realizar en el futuro un estudio más detallado sobre la estructura de este receptor, determinando algunas características bioquímicas, como el punto isoeléctrico y el contenido en carbohidratos. Entre las características estructurales podría determinarse si este receptor está formado por dos dominios proteicos unidos por enlaces de tipo N entre carbohidratos, si está constituido por una única o varias subunidades activas o si se encuentra asociado a otras proteínas implicadas en los mecanismos de transducción de señales formando un complejo intracelularmente activo.

En todos los ensayos hemos utilizado como **control** la línea mononuclear U937 pues, como ya se ha comentado, es en monocitos y líneas celulares relacionadas donde se han caracterizado con más detalle los receptores $Fc\alpha$. La banda correspondiente al receptor de IgA en las células mesangiales de rata es coincidente con la banda procedente de las células U937. La anchura de la banda correspondiente a las U937 es mayor que la del receptor de células mesangiales, lo que podría indicar que existen diferencias en cuanto a la afinidad por IgA o en cuanto al número de receptores de membrana en ambos tipos celulares.

La **especificidad** de la interacción entre la IgA y su receptor en las células mesangiales se determinó realizando el aislamiento del receptor de membrana en presencia de un exceso de IgA o IgG solubles. La competencia por la unión al receptor entre la IgA del medio y la Sepharosa-IgA se traduce en una disminución de la intensidad de la banda de 60 kDa, lo que no ocurre cuando el inhibidor empleado es IgG. Estos resultados corroboran los obtenidos en los ensayos de unión de proteínas marcadas, confirmando que la proteína de la membrana de las células mesangiales es específica para IgA.

El **receptor de IgG** aislado de la membrana de las células mesangiales de rata por inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales posee unas características moleculares y genéticas muy parecidas al receptor $Fc\gamma RII$ de los macrófagos murinos y humanos [92]. Se trata de una proteína con un peso molecular aproximado de 45 kDa, específica para las subclases IgG1 e IgG2b.

En nuestras condiciones de trabajo, el receptor de IgG aislado de las membranas de las células mesangiales de rata mediante cromatografía de afinidad con Sepharosa-IgG

presenta un peso molecular aparente de 50 kDa, próximo al descrito en la literatura [92], pero claramente menor que el del receptor de IgA en las mismas células.

Estos resultados indican que los receptores $Fc\gamma$ y $Fc\alpha$ de las células mesangiales son dos proteínas claramente diferentes en sus características moleculares, y posiblemente funcionales, y que ambos receptores son independientes en cuanto a la unión de inmunoglobulinas, presentando especificidades distintas y sin reacción cruzada.

Se han descrito diversos factores que actúan como **moduladores del receptor de IgA**. Algunos factores del crecimiento, como el GM-CSF y el G-CSF producen un aumento de unas tres veces en la afinidad del receptor $Fc\alpha$ de los neutrófilos humanos [41]. Otros factores externos actúan sobre las células produciendo una sobreexpresión de los receptores para IgA. La línea promielocítica HL-60, que en condiciones normales no expresa receptores para IgA, modifica su patrón de expresión por tratamiento con calcitriol o dimetilsulfóxido, agentes promotores de la diferenciación celular [51, 204]. El PMA aumenta de forma dependiente de la dosis y del tiempo la expresión de los receptores $Fc\alpha$ en los monocitos y líneas celulares relacionadas [54]. Nuestros experimentos con U937 están de acuerdo con estos resultados, observando una banda más intensa cuando las células U937 se incuban durante 18 horas con una concentración 10^{-8} M de PMA. Sin embargo, los receptores de IgA en las células mesangiales no aumentan de forma acusada por incubación con PMA. Esta discrepancia podría atribuirse a posibles diferencias en las vías de transducción de la señal intracelular o a las condiciones óptimas de tiempo de incubación y concentración de PMA, que pueden ser distintas para la activación de cada tipo de célula.

Cuando las células mesangiales se estimulan durante 18 horas con los AIGa o con la IgA monomérica se observa un aumento apreciable de la intensidad de la banda correspondiente al receptor para IgA respecto de las células sin estimular. Este incremento no se aprecia cuando la incubación es más corta, por ejemplo, 3 o 6 horas, lo que implica que posiblemente se requiere la síntesis *de novo* del receptor de IgA en las células mesangiales. Otros investigadores han obtenido idénticas conclusiones en monocitos y neutrófilos humanos tratados con IgA, observando una rápida estimulación de la expresión de los receptores de IgA de forma dependiente de la concentración de IgA [40, 54].

El número de receptores $Fc\gamma$ de células mesangiales y algunas líneas celulares macrofágicas aumenta considerablemente en presencia de $IFN-\gamma$, dibutilil AMPc y CSF-1.

Este incremento va asociado con un aumento en la capacidad de fagocitosis de inmunocomplejos de IgG por las células mesangiales [95]. Otros factores no afectan al número de receptores de IgG en monocito/macrófagos, como el GM-CSF, $\text{TNF}\alpha$, IL-3, 4 y 6. Por el contrario, la expresión de los receptores para IgA en monocitos, células U937 y HL-60 disminuye o no se ve afectada por $\text{INF-}\gamma$, α y β , ni por interleucina 4 [51, 204]. En nuestras condiciones experimentales, no observamos aumento de la intensidad de la banda correspondiente al receptor de IgA de las células mesangiales en presencia de $\text{INF-}\gamma$, pero sí lo hacen los receptores para IgG.

Se necesitan más investigaciones para determinar otros factores solubles que actúen como activadores o supresores de la expresión del receptor de IgA en las células mesangiales, entre los que podrían incluirse algunas citocinas y factores de crecimiento, proteínas de la matriz y glucocorticoides. De igual forma, habría que dedicar algún esfuerzo al estudio de las vías de activación que conducen a la expresión del receptor de IgA pues sobre este tema no se ha investigado hasta el momento. Podría determinarse, por ejemplo, si algunas proteínas quinasas están implicadas en estas señales intracelulares.

1.2.2.- Expresión del mRNA del receptor de IgA:

Recientemente Maliszewski y col. [55] han clonado el cDNA del receptor $\text{Fc}\alpha$ en monocitos humanos a partir de una librería de cDNA construida en la línea monocítica U937 y transfectada a COS-7, seleccionando después las células que expresan el receptor $\text{Fc}\alpha$ con anticuerpos monoclonales. En la secuencia de pares de bases del plásmido pHu $\text{Fc}\alpha\text{R}$ está contenida una región que codifica una proteína de 287 aminoácidos. Los primeros 21 aminoácidos corresponden a la secuencia señal y el resto a la proteína madura con un tamaño molecular previsto de 29.9 kDa, valor que coincide con el tamaño (32-36 kDa) del núcleo proteico del receptor $\text{Fc}\alpha$ de monocitos humanos [54, 44]. La secuencia primaria prevista contiene una zona extracelular de 206 aminoácidos, una región transmembrana de 19 residuos y un dominio intracitoplásmico de unos 41 aminoácidos. La región extracelular está constituida por dos dominios y posee seis posibles sitios de N-glicosilación que, junto con las uniones de tipo O, podrían dar cuenta del elevado peso molecular (60 kDa) que

presenta el receptor $Fc\alpha$ nativo. La secuencia de aminoácidos de la región extracelular del receptor $Fc\alpha$ presenta gran homología con otros receptores Fc (sobre todo con los de IgG e IgE) y con otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y en él se conservan algunos residuos característicos de este grupo [7, 55].

En las preparaciones de RNA poliadenilado procecentes de células U937, monocitos humanos de sangre periférica y polimorfonucleares se observaron dos bandas de tamaño aproximado de 2.8 y 2.6 kb, pero no se observaron estos dos transcritos en las preparaciones de linfocitos T y B [55].

Nosotros hemos medido la expresión del receptor de IgA utilizando el plásmido pHuFc α R en los ensayos de hibridación mediante técnicas de Northern blot, a partir de preparaciones de RNA procedentes de **células mesangiales**, tanto de origen humano como de rata. Las células mesangiales de rata y humanas contenían un mRNA de tamaño aproximado de 2.8 kb, comparable con el mRNA del receptor $Fc\alpha$ de las células U937, aunque menos abundante.

Al igual que se observó en la purificación del receptor de membrana, la estimulación de las células U937 con PMA aumentó significativamente la expresión de los mensajeros del receptor $Fc\alpha$, hecho que no fue observado en las células mesangiales. La presencia de IgA en el medio de incubación indujo una sobreexpresión del mRNA del receptor en las células mesangiales, más acusado cuando la estimulación se realiza con AIgA. Por otro lado, el IFN- γ causó una sobreexpresión de los receptores de IgG de las células mesangiales, pero no afectó a los de IgA.

Estos resultados sugieren que el receptor de IgA de las células mesangiales puede ser incluido en el grupo de los receptores $Fc\alpha$, ya descritos en otros tipos celulares, como monocitos, neutrófilos o macrófagos [7, 8].

La posibilidad de que todos los resultados anteriormente comentados se deban a una contaminación por macrófagos del cultivo de células mesangiales queda descartada por completo. En nuestras condiciones de trabajo los macrófagos peritoneales no sobreviven más allá de los primeros días desde el inicio del cultivo. Por otro lado, además de sus características morfológicas observadas al microscopio, las células mesangiales cultivadas presentan tinción negativa para el antígeno Ia, lo que las distingue claramente de los macrófagos.

1.3.- PAPEL DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA INTERACCION ENTRE LA IgA Y LAS CELULAS MESANGIALES

La IgA1 es una molécula con un elevado contenido en carbohidratos unidos a través de enlaces de tipo N o de tipo O. Existen cinco uniones O-glicosídicas, localizadas en la región bisagra y de composición sencilla: uno de los enlaces contiene un solo residuo de GalNAc, mientras que los cuatro restantes poseen uniones Gal-(β 1-3)-GalNAc y en algunas ocasiones poseen residuos de ácido siálico terminales. Las uniones N-glicosídicas son más complejas en su estructura y contienen Gal, GalNAc, manosa y ácido siálico [15-17].

Tres de los **carbohidratos mayoritarios** contenidos en la estructura de la IgA han sido objeto de nuestro estudio: β -D-Gal, β -D-GalNAc y β -D-GlcNAc. Concretamente hemos estudiado si estos carbohidratos participan de alguna forma en la unión de la IgA a las células mesangiales.

Realizamos ensayos de inhibición de la unión de **IgA** a las células mesangiales de rata en cultivo en presencia de los azúcares, observando un descenso apreciable, sobre todo con Gal y GalNAc. Estas observaciones no se han demostrado en otro tipo de receptores de inmunoglobulinas. Concretamente, los carbohidratos de la molécula de IgE no participan en la unión al receptor Fc ϵ [210].

Estos resultados nos llevan a la conclusión que posiblemente los carbohidratos contenidos en la estructura de la inmunoglobulina participan de forma importante en la interacción con el receptor de las células mesangiales. Podrían existir dos posibilidades para esta intervención de los carbohidratos: participación activa, por interacción directa con el receptor celular, o pasiva, es decir, los carbohidratos pueden mantener los dominios C_H2, C_H3 y la región bisagra en una determinada disposición espacial que permita que la interacción con el receptor se realice con alta afinidad. La primera posibilidad implicaría la existencia de un segundo tipo de receptor en la membrana de las células mesangiales, posiblemente el receptor de ASG para glicoproteínas desializadas, capaz de unir IgA a través de sus oligosacáridos. Si la segunda posibilidad fuese cierta, entonces los oligosacáridos modularían la unión de la IgA a su receptor Fc α en las células mesangiales.

Nos planteamos entonces realizar otros experimentos de unión utilizando como ligando la **IgA parcialmente desializada**. La eliminación de ácido siálico del extremo final

de las cadenas hidrocarbonadas de la IgA deja expuestos otros restos azucarados, en su mayoría de Gal [30]. Los resultados obtenidos muestran una unión saturable en el rango de concentraciones estudiadas, específica para desIgA pero no para IgG o IgM. El análisis de Scatchard demuestra la presencia de un solo tipo de sitios de unión de desIgA en las células mesangiales; sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que existan dos tipos de sitios de unión con la misma afinidad. Aunque las células mesangiales unen una mayor cantidad de desIgA que de IgA intacta, ambas proteínas interactúan de forma similar, ya que los valores de constante de afinidad (10^8 M^{-1}) y número de sitios por célula (10^5) están en el mismo orden de magnitud.

Mediante ensayos de inhibición con los fragmentos de la IgA determinamos que el sitio de interacción entre la desIgA y las células mesangiales reside en la región Fc, al igual que ocurre con la IgA intacta. Sin embargo, los valores de inhibición con carbohidratos son superiores cuando se estudia la unión de desIgA, lo que indica un papel más relevante de las estructuras hidrocarbonadas en la interacción entre las células mesangiales y la molécula parcialmente desializada.

El receptor de ASG es una lectina que reconoce los enlaces O-glicosídicos de diferentes glicoproteínas y se ha caracterizado principalmente en células hepáticas [26-28]. *En los hepatocitos humanos y líneas celulares relacionadas dicho receptor presenta una gran afinidad por la IgA1, principalmente por los carbohidratos contenidos en la región bisagra (Gal y GalNac) [29, 30].*

En muchos de los estudios encaminados a la determinación de los receptores ASG se ha utilizado como ligando el **orosomucoide desializado** [27, 30]. El orosomucoide es una glicoproteína no relacionada con el grupo de la inmunoglobulinas, que posee cuatro ramas de oligosacáridos con ácido siálico en cada extremo terminal. La desialización por tratamiento con neuraminidasa deja expuesto un residuo de Gal terminal en cada rama de la proteína [35]. En experimentos similares a los descritos para IgA y desIgA hemos demostrado que la unión del ASOR a las células mesangiales es dependiente de la dosis de ligando y saturable. Determinamos aproximadamente 10^6 sitios de unión por célula mesangial, con una afinidad del orden de 10^7 M^{-1} , menor que la determinada en la línea celular HepG2 [27]. Los resultados de inhibición demuestran que en las células mesangiales existe un receptor capaz de unir ASOR específicamente a través de sus residuos de Gal.

Las **inhibiciones cruzadas** aportan conclusiones importantes en este campo. Nuestros resultados demuestran que la IgA, la desIgA y, en menor grado, el ASOR, compiten por unirse, al menos en parte, al mismo receptor en las células mesangiales.

Tomana y col. [30] llevaron a cabo el aislamiento del receptor asialoglicoproteico de la membrana de las células hepáticas HepG2, mediante cromatografía de afinidad con IgA1 polimérica o monomérica unidas a Sepharosa. En ambos casos obtuvieron una proteína mayoritaria de aproximadamente 42 kDa de peso molecular. Sin embargo, en nuestros experimentos con células mesangiales se observa la presencia de una única banda de 60 kDa capaz de unirse a Sepharosa-IgA. Además, cuando intentamos aislar el posible segundo tipo de receptor para IgA en las células mesangiales, utilizando como soporte Sepharosa-desIgA, no obtuvimos una banda diferente de la de 60 kDa. Este resultado negativo podría ser debido a que la purificación del receptor ASG requiere otras condiciones experimentales, como una solución de lisis celular diferente o distinto tiempo de incubación con la Sepharosa-desIgA.

Por estas razones sólo podemos afirmar que en las células mesangiales existe, al menos, un receptor específico para IgA. Hemos demostrado que la interacción entre la inmunoglobulina y el receptor se produce a través de la región constante Fc. Sin duda los oligosacáricos de la IgA, principalmente los de la región bisagra, están implicados en la interacción con las células mesangiales, aunque no podemos asegurar si actúan como moduladores de la unión o participan activamente en ella. En este sentido, Aramaki y col. [211] demostraron, en macrófagos peritoneales de ratón, que los receptores de carbohidratos participan en la fagocitosis mediada por los receptores Fc. La activación de los receptores Fc α y Fc γ de monocitos humanos conduce a la síntesis de TNF e IL-1 β , que puede ser bloqueada en gran parte por la presencia de Gal en el medio de incubación [64, 211].

Es probable que en las células mesangiales exista un segundo tipo de receptor para IgA, diferente del receptor Fc α y similar al receptor ASG, capaz de unir, además de ASOR, IgA y desIgA a través de sus residuos hidrocarbonados. Serían necesarias más investigaciones para confirmar estas primeras evidencias. En este sentido podría realizarse el aislamiento del receptor de membrana de las células mesangiales utilizando como soporte de la cromatografía de afinidad Sepharosa-ASOR. Pero, sin duda, la disponibilidad de la sonda correspondiente al cDNA que codifica el receptor ASG descrito en otros tipos

celulares [28, 26] supondría un paso definitivo.

Todos estos resultados refuerzan el papel potencial que ejercen las regiones hidrocarbonadas de las moléculas de IgA1 en la patogénesis de la nefropatía IgA. En este sentido, los estudios preliminares sobre la composición de carbohidratos de la IgA de los enfermos con nefropatía IgA no son concluyentes. Algunos investigadores sugieren que existen deficiencias en los residuos de Gal y NAcGal, pero este hecho no ha sido confirmado por otros [168, 212]. Puestos que estos pacientes presentan usualmente episodios de hematuria macroscópica asociados con infecciones del tracto respiratorio, una hipótesis alternativa podría ser que la neuraminidasa liberada en estos momentos [46] podría ser la causante de una mayor exposición de los residuos de carbohidratos de la IgA, lo que traería como consecuencia una enfermedad por inmunocomplejos autólogos [171, 214, 215] o una mayor capacidad de unión a las células mesangiales, como hemos observado en nuestro estudio.

2.- ASPECTOS FUNCIONALES DEL RECEPTOR DE IgA EN CELULAS MESANGIALES

Una vez determinados algunos aspectos estructurales del receptor de IgA y algunos factores reguladores de su expresión, hemos estudiado las funciones de este receptor en las células mesangiales.

Las células mesangiales son capaces de unir e internalizar inmunocomplejos de IgG a través del receptor específico $Fc\gamma$ [92, 94, 97, 101]. La interacción entre la IgG y su receptor en las células mesangiales conduce a una rápida activación celular, con la consiguiente síntesis y liberación al medio extracelular de diversos mediadores de la inflamación, entre los que destacan PGE₂, PAF, productos de la lipooxigenasa, ión superóxido y algunas citocinas, como IL-1 y 6 y MCP-1 [93, 94, 98, 99, 100]. Entre los mecanismos de activación celular estudiados se encuentran los flujos de calcio intracelular y la activación de la PLC, con la subsiguiente liberación de IP₃ [101].

Nuestro grupo de trabajo ha sido el primero en señalar la importancia de la interacción entre las células mesangiales y los inmunocomplejos de IgA y su posible participación en la patogenia de la nefropatía IgA. En este sentido se ha demostrado que las células mesangiales de rata estimuladas con AIGa solubles sintetizan y liberan al medio extracelular PAF, PGE_2 , ión superóxido, fibronectina y colágeno ([172] y resultados no publicados). Estos estudios iniciales sugieren la importancia de la caracterización que tiene la estructura molecular del receptor de IgA en la célula mesangial, así como la determinación de algunos aspectos funcionales no descritos hasta el momento.

En todos los estudios de función utilizamos AIGa solubles obtenidos por calentamiento, con características similares a las de los inmunocomplejos [216], y determinamos la internalización y degradación de los mismos a través del receptor de IgA, la movilización del calcio intracelular y la producción de algunas citocinas, así como los efectos mitogénicos de la IgA sobre las células mesangiales. Estas determinaciones se llevaron a cabo en paralelo con AIGG solubles, en parte usados como control, en parte utilizados para comparar el efecto de ambas inmunoglobulinas sobre las células mesangiales.

2.1.- UNION, INTERNALIZACION Y DEGRADACION DE IgA POR LAS CELULAS MESANGIALES:

Numerosos estudios han demostrado que las células mesangiales participan en los procesos de fagocitosis de ciertas macromoléculas, como ferritina, carbón coloidal, proteínas en forma agregada e inmunocomplejos. En estudios *in vitro* con células mesangiales se estudió la endocitosis de partículas de zimosán opsonizado y de oro coloidal recubiertas de suero [81, 91].

Neuwirth y col. [98] fueron los primeros en demostrar que los inmunocomplejos de IgG unidos a partículas de ^{195}Au coloidal o a eritrocitos de carnero eran endocitados a 37°C por las células mesangiales de rata a través de un mecanismo dependiente de la región Fc de la inmunoglobulina. Por microscopía de contraste de fase observaron una distribución homogénea de partículas de oro retenidas por las células mesangiales en cultivo. Este fenómeno de fagocitosis es dependiente del tiempo, alcanzando la saturación

aproximadamente después de 60 minutos de incubación.

Nuestros estudios de catabolismo iban encaminados a determinar qué ocurría con la **IgA** una vez que se estaba unida a su receptor específico en las células mesangiales. Para ello, determinamos la cinética de la unión, internalización y degradación de la IgA a 37°C por las células mesangiales de rata en cultivo. El destino de la IgA unida a las células mesangiales puede transcurrir por dos caminos alternativos: disociación de su receptor o endocitosis, con la subsiguiente degradación de la proteína. Los resultados demuestran que, cuando se cambia la temperatura de incubación a 37°C, parte de la IgA inicialmente unida a 4°C pasa al interior de la célula mesangial, donde posteriormente es degradada, posiblemente por los enzimas lisosomales. La **internalización y degradación** del ligando se produce de forma rápida, pues incluso a tiempos cortos de incubación se detectan porcentajes de degradación significativos.

El **estado molecular de la IgA** es un factor determinante en estos procesos de fagocitosis, pues en todos los experimentos realizados la degradación de los AIgA fue mayor que la determinada para la IgA monomérica. Jones y col. [217] observaron en monocitos y células U937 diferencias en el catabolismo de los inmunocomplejos dependiendo de la forma molecular de la proteína.

Sin embargo, no toda la IgA unida es endocitada, sino que una cantidad considerable sufre **disociación** del receptor y es eliminada al medio extracelular, apareciendo como proteína intacta. Este hecho puede indicar que la capacidad de las células mesangiales de eliminar los inmunocomplejos de IgA circulantes depositados en el glomérulo es limitada y quizás, fácilmente saturable cuando *in vivo* se produce una acumulación excesiva de dichos inmunocomplejos, como ocurre en la nefropatía IgA [111, 170].

El catabolismo de la IgA por las células mesangiales es un proceso mediado específicamente por el **receptor Fc α** . Esta conclusión se obtuvo de los resultados de inhibición con los fragmentos Fc y F(ab) de la IgA. La presencia del fragmento Fc inhibe significativamente los parámetros de degradación y asociación a células, mientras que con el fragmento F(ab) el descenso fue prácticamente inapreciable.

Los experimentos de unión, internalización y degradación se realizaron comparativamente con **IgG**, tanto en forma monomérica como de agregados solubles, observándose una cinética de catabolismo similar a la de la IgA, aunque los porcentajes de

degradación fueron algo menores y la cantidad de proteína disociada algo mayor. En cualquier caso, los procesos degradativos se estabilizan transcurridos 60 minutos aproximadamente.

Es importante destacar que los agregados solubles de **desIgA** también son endocitados y degradados por las células mesangiales. La cinética de degradación es muy similar a la de los **AlgA**, aunque se requieren más experimentos que demuestren si estos procesos tienen lugar únicamente a través del receptor $Fc\alpha$ o si también existe participación de los receptores de carbohidratos.

Estudiamos también si, al igual que en otras células, se requería la presencia de **calcio** en el medio de incubación para la fagocitosis de los **AlgA**. Los resultados del catabolismo con EDTA en el medio como quelante de los iones Ca^{2+} demostraron que, aunque el calcio no es necesario para la unión de la **IgA** a las células mesangiales, si lo es para que las proteínas unidas sean endocitadas y posteriormente degradadas. Resultados análogos se han descrito en los macrófagos murinos, que requieren una concentración de calcio óptima para que se produzca la fagocitosis mediada por los receptores $Fc\gamma$ [218]. Sin embargo, otros autores observaron procesos de fagocitosis independientes del calcio [219].

Los bajos porcentajes de degradación obtenidos demuestran que las células mesangiales de rata no son células fagocíticas por excelencia, como podrían ser los **macrófagos peritoneales** de rata. Estas células macrofágicas son capaces de endocitar **AlgA** y **AlgG** humanos de forma dependiente de la dosis y del tiempo de incubación [33, 61, 205, 206, 216, 220]. Nosotros realizamos estudios comparativos de unión de agregados solubles de **IgA**, **desIgA** e **IgG** a células mesangiales y macrófagos peritoneales de rata en cultivo. Los resultados demuestran que la capacidad fagocítica de las células mesangiales es muy inferior a la que muestran los macrófagos. Estas observaciones están de acuerdo con las obtenidas por otros investigadores, que midieron una mayor captación de partículas de oro coloidal recubiertas de inmunocomplejos de **IgG** por parte de los macrófagos peritoneales que por las células mesangiales de rata [97, 98].

Según estas observaciones, es posible que una de las funciones más importantes de los receptores de **IgA** e **IgG** en las células mesangiales *in vivo* sea la eliminación de las proteínas correspondientes y los inmunocomplejos que se depositan frecuentemente en el mesangio, debido a que la región mesangial está "bañada" muy a menudo por el plasma,

del que sólo está separada por una capa de células endoteliales. El depósito masivo o continuado de inmunocomplejos estimularía a la célula mesangial para sintetizar citoquinas y otros mediadores de la inflamación que podrían participar en el daño glomerular.

Algunos estudios han determinado que ciertos **factores solubles influyen en la fagocitosis** de los inmunocomplejos por las células mesangiales. Así, la AII aumenta la captación de partículas recubiertas IgG2b, mientras que citocalasina B, ANP, dopamina, AMPc y GMPc reducen de forma significativa la internalización [96]. La morfina disminuye *in vitro* la captación de IgG humana por células mesangiales y macrófagos peritoneales de rata, mientras que *in vivo* aumenta los depósitos de inmunocomplejos de IgG en mesangio [97]. Santiago y col. [95] estudiaron la internalización a 60 minutos y 37°C de los inmunocomplejos de IgG marcados con ¹²⁵I, observando un aumento de 2-3 veces en presencia de CSF-1, dbcAMP e IFN-γ.

Sin embargo, nada se ha demostrado en cuanto a los factores que modulan *in vivo* la captación de IgA por las células mesangiales. Estos resultados serían de gran importancia en la comprensión de la patogenia del daño glomerular en la nefropatía IgA. En las biopsias renales de estos enfermos siempre aparecen depósitos de IgA y, excepto en raras ocasiones, nunca desaparecen [221]. En algunos enfermos se ha detectado una rápida acumulación de células polimorfonucleares en el riñón coincidiendo con la desaparición de gran parte de los depósitos renales de IgA [222]. Puesto que la fagocitosis mediada por IgA en los neutrófilos humanos aumenta en presencia de GM-CSF [41], podríamos pensar que la presencia de algunas citocinas en el microentorno del mesangio podría modificar la capacidad fagocítica de las células residentes e infiltrantes. Teóricamente, todas las maniobras capaces de incrementar la fagocitosis de los inmunocomplejos por parte de las células glomerulares serían de gran interés en el tratamiento de la nefropatía IgA.

2.2.- MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL INTRACELULAR

Existen diversas rutas de mensajeros implicadas en la transducción de la señal intracelular, entre las que destacan la señal IP₃/calcio, los canales de calcio independientes (mediados por receptor) o dependientes de voltaje y los sistemas adenilato ciclasa/AMPc,

guanilato ciclasa/GMPc, diacilglicerol(DG)/PKC y factores de crecimiento/tirosina quinasa/tirosina fosfatasa [223].

Entre todos los mensajeros intracelulares, el Ca^{2+} es uno de los más ubicuos y está implicado en la regulación de un gran número de respuestas celulares, como la contracción celular, la secreción de diversos productos, la activación de las células sanguíneas, la glicogenolisis y gliconeogenesis, así como en el crecimiento, diferenciación y división celular [224]. Por ello, su concentración y localización subcelular están controladas en un rango muy estrecho. Los iones calcio se encuentran en cuatro sitios diferentes en las células: medio extracelular, citoplasma, mitocondria y retículo endoplásmico. Solo el calcio presente en el citoplasma actúa como segundo mensajero, mientras que el retículo endoplásmico constituye el principal orgánulo que libera y secuestra el catión del citoplasma [223, 224].

En general, cuando el sistema del calcio participa como mensajero en la transducción de la señal producida tras la interacción ligando-receptor, el metabolismo de los fosfatidilinosoles está implicado. La unión al receptor de membrana estimula una PLC específica de fosfatidilinositol, que suele estar acoplada a proteínas G. Este enzima cataboliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, produciendo IP_3 y DG. Estas dos moléculas actúan como segundos mensajeros intracelulares, causando la movilización del calcio de las reservas internas de la célula (por parte del IP_3) y estimulando una PKC específica (por parte del DG). En cualquier caso, todas estas señales conducen a la fosforilación de diversas proteínas que participan en una gran variedad de funciones celulares. Las señales que acompañan al aumento de $\text{Ca}^{2+}/\text{IP}_3$ participan en la respuesta inicial de la célula al estímulo. Los acontecimientos celulares en los que la PKC está involucrada forman parte de la respuesta celular mantenida. La integración de ambas respuestas constituye todos los mecanismos de activación celular que pueden ocurrir cuando un agonista se une a su receptor específico de membrana [224].

Hemos estudiado si las variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ forman parte de las diferentes señales de transmembrana que tienen lugar en el proceso de activación de las células mesangiales a través de los receptores para IgA. No se han observado variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en presencia de IgA monomérica, pero sí con AIgA. Esto sugiere que la unión del ligando no es suficiente para transmitir el cambio conformacional al citosol o a los dominios transmembrana del receptor, sino que se requiere el "cross-linking" (agregación de los

receptores) para que la señal sea efectiva. Resultados similares se han obtenido en los neutrófilos humanos estimulados con inmunocomplejos de IgG [225].

Los **AIgA** producen una rápida movilización de los iones calcio en el citosol de las células mesangiales, lo que podría indicar que el aumento es debido a una salida de calcio desde las reservas intracelulares, probablemente mediada por IP_3 . El aumento detectado es considerable, pero menor que el producido por otros agonistas, como la AII y la ET-1 ([207] y resultados propios). El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ es transitorio, pues con el tiempo se retorna hacia los valores basales. Sin embargo, incluso después de 4 minutos de la adición de los AIgA se observa un discreto aumento en los niveles de calcio.

La presencia de **TMB-8**, un inhibidor de la salida del calcio de los orgánulos intracelulares, produce un descenso en el pico de máxima $[Ca^{2+}]_i$. Cuando se añade al medio el quelante de los iones divalentes **EGTA**, el pico brusco no se ve afectado, pero el retorno a los niveles basales es más rápido. Estos dos hechos demuestran que existen dos componentes en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células mesangiales estimuladas por AIgA. En un principio se produce la liberación de los iones calcio almacenados en los depósitos intracelulares y posteriormente se permiten los mecanismos de entrada de iones desde el espacio extracelular, contribuyendo ambos orígenes al aumento total de la $[Ca^{2+}]_i$.

Estudiamos también la respuesta de las células mesangiales a la estimulación con AIgG. En nuestros experimentos, la activación de las células con AIgG produce una cinética de movilización de calcio intracelular similar a la observada con los AIgA, con un aumento inicial de la $[Ca^{2+}]_i$ y un descenso gradual, algo mantenido, hacia los valores basales. Otros autores, han demostrado el mismo incremento rápido en la $[Ca^{2+}]_i$ en macrófagos peritoneales de ratón y líneas celulares relacionadas estimuladas con AIgG [218, 219]. Sin embargo, la respuesta de calcio observada en las células mesangiales estimuladas con inmunocomplejos de IgG presentó una cinética más lenta, pero más estable, en cuanto al tiempo necesario entre la estimulación y la activación de la célula [101]. Estos autores demostraron que el aumento del calcio era debido a una salida de las reservas internas y a una entrada de los iones externos, pero la activación celular no transcurría vía PLC, pues no apreciaron un incremento significativo de IP_3 . Por otro lado, en nuestro sistema, el rápido incremento inicial observado con los AIgA es bastante mayor que el correspondiente a los AIgG, lo que podría ser un indicativo de que los receptores de ambas

inmunoglobulinas presentan algunas vías de activación intracelular distintas.

Entre otros posibles mecanismos de transducción de la señal determinamos si la activación de las células mesangiales con AIgA se producía a través de proteínas G y si conducía, en último término, a la estimulación de la PKC.

La activación de las células mesangiales con AIgA no se produce a través de **proteínas G_i**, ya que la presencia de la toxina de pertussis como inhibidor de estas proteínas no disminuyó el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a los AIgA. Sin embargo, estos hechos no descartan la posibilidad de que existan en las células mesangiales otras proteínas G insensibles a toxina de pertussis, o incluso, que la activación de estas células no esté asociada a una PLC dependiente de fosfatidilinositol, como ya se ha descrito en otros tipos celulares [225, 226].

Los estudios realizados en presencia del inhibidor de la **PKC**, estaurosporina, demuestran que en la activación de las células mesangiales a través de los receptores de IgA participa este enzima, a tiempos más largos, produciendo la fosforilación de diversas proteínas, cuya naturaleza está por determinar [106]. Un fenómeno similar se ha detectado en otros tipos celulares [223].

2.3.- PRODUCCION DE CITOCINAS POR LAS CELULAS MESANGIALES

Diversas citocinas participan en la patogénesis del daño renal modificando las propiedades de las células glomerulares intrínsecas e infiltrantes [102, 109]. En los últimos años, gracias al desarrollo de algunos modelos animales de glomerulonefritis, se ha avanzado mucho en el conocimiento de los factores que inducen activación mesangial *in vivo* [103, 105, 169]. La mayoría de los estudios han determinado las acciones de PDGF, IL-1 y TGF- β , aunque es muy probable que estén implicados muchos más factores de crecimiento y citocinas [90, 112]. Entre estas citocinas, TNF α e IL-6 podrían ser dos buenos candidatos que participan en la patogenia del daño glomerular en la nefropatía IgA. Montinaro y col. [179] demostraron, en un modelo experimental de nefropatía IgA, que las citocinas IL-1, IL-6 e IFN γ , administradas sistémicamente, actúan de forma sinérgica en el desarrollo del daño glomerular, aumentando la hiper celularidad mesangial, la infiltración de células

proinflamatorias, la proteinuria y la hematuria.

Nuestros experimentos *in vitro* demuestran que las células mesangiales de rata y humanas son capaces de sintetizar y liberar al medio exterior $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 cuando son estimulados con IgA en forma de agregados solubles, aunque los valores detectados son siempre inferiores a los determinados con LPS. El tratamiento con polimixina B excluye la posibilidad de que la contaminación de las muestras con endotoxina sea la responsable de la síntesis elevada de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6.

El $\text{TNF}\alpha$ es principalmente un producto de los fagocitos mononucleares, pero también puede ser producido por las células glomerulares, sobre todo por las células mesangiales [125, 126]. Varios estudios han caracterizado los efectos biológicos del $\text{TNF}\alpha$ sobre las células mesangiales, entre los que destacan la contracción celular, citotoxicidad, proliferación, liberación de mediadores lipídicos e ión superóxido y síntesis y/o expresión de diversas citocinas y factores de crecimiento, como IL-1, 6 y 8, MCP-1, GM-CSF e IP-10 [99, 102, 126, 130-135].

En nuestros experimentos hemos medido la producción de $\text{TNF}\alpha$ por las células mesangiales mediante el ensayo de citotoxicidad con las células L929. Los A IgA indujeron una síntesis de $\text{TNF}\alpha$ dosis-dependiente, alcanzándose el máximo de producción después de 6 horas de incubación. La presencia de IgA en forma monomérica no estimula prácticamente la liberación de $\text{TNF}\alpha$. Estos datos fueron apoyados por los resultados de Northern blot, detectando en las células mesangiales estimuladas con A IgA un incremento de la expresión del mRNA del $\text{TNF}\alpha$ de 4 veces respecto del basal. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros autores en células mesangiales de rata estimuladas con LPS [127] y en macrófagos murinos [117], que caracterizaron el mensajero del $\text{TNF}\alpha$ como dos bandas de hibridación.

Los A IgG indujeron una síntesis y expresión de $\text{TNF}\alpha$ dependiente de la dosis y del tiempo, de forma análoga a los A IgA. Otros autores han observado que la activación de los receptores $\text{Fc}\alpha$ y $\text{Fc}\gamma$ en los monocitos humanos con IgA e IgG induce una producción de $\text{TNF}\alpha$ similar, máxima después de 12 horas de incubación [64, 121].

La IL-6 es producida por una gran variedad de células, entre las que se incluyen las células mesangiales, bajo estimulación con LPS y algunas citocinas y factores de crecimiento [141, 144-146]. El papel fundamental de la IL-6 en el glomérulo es su actuación como

factor autocrino, induciendo la proliferación de las células mesangiales *in vitro* [150].

Nuestros resultados muestran que las células mesangiales, tanto de origen humano como de rata, sintetizan IL-6 cuando son estimuladas con AIGa y AIGG, de forma dependiente de la dosis del agonista. La máxima cantidad de esta citocina puede ser detectada tras 12 horas de incubación. La forma monomérica de la IgA provoca una discreta liberación de IL-6 en las células mesangiales. Por otra parte, no existen diferencias cuando se utilizan AIGa o ADesIgA, demostrando que ambas formas de la inmunoglobulina son capaces de activar la síntesis de IL-6 en las células mesangiales. En los ensayos de Northern blot con la sonda de la IL-6 se detectó una sobreexpresión de los mensajeros de IL-6 en las células mesangiales de rata estimuladas con AIGa y AIGG (incremento de 4-5 veces el basal). El mensajero está formado por dos bandas de aproximadamente 2.4 y 1.2 kb, análogas a las descritas por otros autores [94, 150, 152].

La producción de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 es inhibida por la **CHX**, lo que confirma la necesidad de la síntesis *de novo* de las proteínas para su posterior liberación al medio extracelular.

Numerosos estudios han demostrado la participación del $\text{TNF}\alpha$ y la **IL-6** en las glomerulonefritis humanas (proliferativas y no proliferativas). Se ha observado una sobreexpresión de $\text{TNF}\alpha$ en las biopsias de pacientes con glomerulonefritis rápidamente progresivas [137] y de IL-6 en las glomerulonefritis mesangioproliferativas, como la nefropatía IgA [152]. La severidad de estas enfermedades se correlaciona con los niveles de estas citocinas en el suero y la orina. En algunos modelos de glomerulonefritis proliferativas los glomérulos de los animales producen y expresan mayores cantidades de $\text{TNF}\alpha$ [136] o de IL-6 [154] que los controles. En un modelo de nefritis nefrotóxica en ratas, el pretratamiento de los animales con $\text{TNF}\alpha$ o IL-1 incrementa la severidad del daño glomerular [227], mientras que la administración de anticuerpo anti- $\text{TNF}\alpha$ es beneficiosa en la evolución de la enfermedad [228]. Sin embargo, en muchas de estas enfermedades renales no se ha determinado el origen exacto de estas citocinas, ni los mecanismos concretos que estimulan en el glomérulo, pudiendo ejercer un efecto directo o mediado por otros factores o citocinas de cuya expresión pudieran ser responsables.

2.4.- PROLIFERACION MESANGIAL

La estimulación de las células mesangiales con diferentes agentes provoca un gran número de reacciones, entre las que se incluyen la proliferación celular, cambios en la morfología de las células y en el fenotipo de secreción y aumento de la producción de proteínas de matriz, así como la liberación de mediadores proinflamatorios [77, 90, 102]. La respuesta proliferativa es un hecho normal en la célula mesangial. Además, la proliferación sirve para repoblar el mesangio después de haber sufrido algún daño celular, por ejemplo, el inducido por la isquemia. Sin embargo, el desequilibrio en el control de la proliferación de las células mesangiales glomerulares constituye una causa inicial y muy importante en la génesis del daño glomerular progresivo [103, 104].

La proliferación mesangial es un hecho muy destacado en algunas enfermedades glomerulares humanas, incluida la nefropatía IgA [76, 103, 170]. Los factores mitogénicos implicados en este proceso pueden ser producto de las células glomerulares intrínsecas, pudiendo actuar de forma autocrina o paracrina [90, 102]. Fujii y col. [229] estudiaron la proliferación de las células mesangiales humanas incubadas con diluciones seriadas de algunos sueros procedentes de enfermos con nefropatía IgA, demostrando que el efecto proliferativo podía ser debido a los inmunocomplejos de IgA contenidos en el suero. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar si los inmunocomplejos depositados en el glomérulo de los enfermos con nefropatía IgA son los responsables directos de la proliferación mesangial que se detecta en estos pacientes.

En nuestros estudios hemos demostrado que las células mesangiales de rata proliferan en presencia de cantidades crecientes de A₁gA y A₁gG. Este hecho se ha demostrado empleando dos ensayos de proliferación diferentes: la captación de [³H]timidina, que determina el grado de síntesis del DNA, y la incorporación del colorante azul de metileno, indicativo del número de células.

El efecto mitogénico de los agregados sobre las células mesangiales es discreto, pero significativo, y además se ve en parte suprimido en presencia de anticuerpos policlonales anti-citocinas. Las mayores inhibiciones se consiguen con el anticuerpo anti-IL-6, indicando el papel activo que puede tener esta citocina en la proliferación mesangial inducida por los agregados.

Hemos observado también que la producción de citocinas es un hecho que precede a la proliferación. La síntesis de $\text{TNF}\alpha$ es máxima a las 6-12 horas de incubación, mientras que después de 24-48 horas, tiempo en que se mide la proliferación, los niveles de $\text{TNF}\alpha$ están cercanos al basal. Los valores máximos de IL-6 se detectan después de las 12 horas de incubación con los agregados y se mantienen relativamente elevados después de 24-48 horas.

Es sabido que el $\text{TNF}\alpha$ induce en las células mesangiales la síntesis de un gran número de citocinas, lípidos bioactivos y radicales del oxígeno, algunos de los cuales presentan efectos mitogénicos sobre estas células [125, 227]. Por otro lado, la producción de IL-6 aumenta cuando las células mesangiales se estimulan con IL-1, PDGF o $\text{TNF}\alpha$ [132, 133, 145, 149]. Los trabajos acerca de la capacidad mitogénica de la IL-6 y del $\text{TNF}\alpha$ sobre las células mesangiales han aportado resultados controvertidos, pues algunos autores demuestran que las dos citocinas poseen actividad inhibidora del crecimiento [153, 102] y otros aseguran que son mitogénicas [131, 150]. En nuestras condiciones de trabajo, la IL-6 recombinante humana es capaz de inducir proliferación en las células mesangiales de rata. Este efecto es específico, pues es abolido en presencia de anticuerpo anti-IL-6.

A la vista de estos resultados se deduce que la proliferación de las células mesangiales en presencia de los AlGA y AlGG puede ser debida, en parte, a un efecto directo de ambas proteínas y, por otra parte, puede estar mediada por otras moléculas, entre las que se pueden incluir seguramente las citocinas $\text{TNF}\alpha$ e IL-6. Un comportamiento análogo ha sido descrito para el PDGF y el bFGF [230]. La proliferación que causan ambos factores sobre las células mesangiales es parcialmente inhibible con anticuerpos anti-PDGF y anti-bFGF, pero también se observa un descenso de la mitogénesis en presencia de anticuerpo anti-IL-6.

VI.- CONCLUSIONES

1.- CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LA INTERACCION ENTRE LA IgA Y LAS CELULAS MESANGIALES:

- La IgA1 monomérica humana es capaz de unirse a las células mesangiales de rata y humanas de forma dosis-dependiente y saturable. La interacción es específica para esta clase de inmunoglobulina y se produce con alta afinidad.

- El sitio de unión está localizado en la región constante de la IgA. Además, los residuos hidrocarbonados (principalmente los de la región bisagra) participan de forma importante en la interacción entre la IgA y las células mesangiales.

2.- CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES Y MOLECULARES DEL RECEPTOR PARA IgA EN LAS CELULAS MESANGIALES:

El receptor mesangial para IgA puede ser incluido en la familia de los receptores $Fc\alpha$, pues comparte varias características con los receptores de este tipo en otras células. Es una proteína con un peso molecular de 60 kDa, que se une específicamente a IgA, y la secuencia y tamaño de su mRNA coincide con los del receptor en monocitos. La expresión del receptor de membrana y del mRNA aumenta en presencia de IgA.

3.- CARACTERISTICAS FUNCIONALES DEL RECEPTOR DE IgA EN LAS CELULAS MESANGIALES:

- Las células mesangiales son capaces de internalizar y degradar los agregados de IgA unidos a la superficie celular, de forma dependiente del tiempo. El catabolismo de los agregados depende de la región constante de la IgA y requiere la presencia de Ca^{2+} en el medio.

- El sistema del calcio actúa como segundo mensajero en la transducción de la señal intracelular producida tras la interacción entre la IgA y su receptor mesangial. El rápido incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} es debido, tanto a la liberación del Ca^{2+} de las reservas intracelulares como a la entrada de los iones desde el espacio extracelular. La activación mesangial a través de los receptores de IgA no parece estar mediada por proteínas G_i , pero si participa la proteína quinasa C.

- Las células mesangiales sintetizan y liberan al medio extracelular las citocinas $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 cuando se estimulan con los agregados solubles de IgA. La producción de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 es dependiente del tiempo y de la dosis de agregados y afecta tanto a los niveles de mRNA como a la síntesis *de novo* de las proteínas.

- La interacción entre los agregados de IgA y las células mesangiales provoca, en último lugar, un incremento en su capacidad proliferativa. Este fenómeno es, en parte, un efecto directo de los agregados y, por otra parte, está mediado por otras moléculas, entre las que se incluyen las citocinas, principalmente la IL-6.

En conjunto, estos resultados indican que las células mesangiales poseen un receptor específico para IgA del tipo $\text{Fc}\alpha$, a través del cual se pueden producir diversos mecanismos de activación celular. Con este trabajo se aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos patogénicos que provocan daño tisular en algunas enfermedades, como la nefropatía IgA, una de las glomerulonefritis más comunes en el mundo.

VII.- BIBLIOGRAFIA

-
- [1] Heremans JF. Immunoglobulin A. En *The Antigens*. Ed. M Sela. Academic Press, New York. 1974;2:365.
- [2] Mestecky J, Kilian M. Immunoglobulin A. *Methods Enzymol.* 1985;116:37.
- [3] Delacroix DL, Dive C, Rambaud JC, Vaerman JP. IgA subclasses in various secretions and in serum. *Immunol.* 1982;47:383.
- [4] Mestecky J, McGhee JR. Immunoglobulin A (IgA): Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* 1987;40:153.
- [5] Procaccia S, Lazzarin A, Colucci A, Gasparini A, Forcellini P, Lazzarova D, Foppa CU, Novati R, Zanussi C. IgM, IgG and IgA rheumatoid factors and circulating immune complexes in patients with AIDS and AIDS-related complex with serological abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.* 1987;67:236.
- [6] Bené MC, Faure G. IgA Nephropathy. *Springer Semin. Immunopathol.* 1987;9:387.
- [7] Schaffer FM, Monteiro RC, Volanakis JE, Cooper MD. IgA deficiency. *Immunodeficiency Rev.* 1991;3:15.
- [8] Kerr MA. The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* 1990;271:285.
- [9] Svehag SE, Bloth B. Ultrastructure of secretory and high-polymer serum immunoglobulin A of human and rabbit origin. *Science* 1970;168:847.
- [10] Underdown BJ, Schiff JM. Immunoglobulin A: Strategic defense initiative at the mucosal surfaces. *Annu. Rev. Immunol.* 1986;4:389.
- [11] Putnam FW, Lui YSV, Low TLK. Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. *J. Biol. Chem.* 1979;254:2865.
- [12] Tsuzukida Y, Wang CC, Putnam FW. Structure of the A2m(1) allotype of human IgA-a recombinant molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979;76:1104.
- [13] Zikan J, Mestecky J, Kulhavy R, Bennet JC. The stoichiometry of J chain in human secretory dimeric IgA. *Mol. Immunol.* 1986;23:541.

- [14] Pumphrey RSH. Computer models of the human immunoglobulins. Binding sites and molecular interactions. *Immunol. Today* 1986;7:206.
- [15] Tomana M, Niedermeier W, Mestecky J, Hammack W. The carbohydrate composition of human myeloma IgA. *Immunochemistry* 1972;9:933.
- [16] Baenziger J, Kornfeld S. Structure of the carbohydrate units of IgA₁ immunoglobulin. *J. Biol. Chem.* 1974;249:7270.
- [17] Field MC, Dwek RA, Edge CJ, Rademacher TW. O-linked oligosaccharides from human serum immunoglobulin A1. *Biochem. Soc. Trans.* 1989;17:1034.
- [18] Bogers WMJM, Stad RK, van Es LA, Daha MR. Immunoglobulin A: Interactions with complement, phagocytic cells and endothelial cells. En *Complement Inflamm.* S. Karger AG. Basel. 1991;8:347.
- [19] Kilian M, Mestecky J, Russell MW. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol. Rev.* 1988;52:296.
- [20] Mestecky J, Moldoveanu Z, Komiyama K, Tomana M, Phillips JO, Russel MW, Brown TA, Crago SS, Moro I. Interaction of IgA with nonlymphoid cells. En *Mucosal Immunity and Infections at Mucosal Surfaces* Eds: W Strober, ME Lamm, JR McGhee, SP James. Oxford University Press, New York. 1988, pp259.
- [21] Apodaca G, Bomsel M, Arden J, Bredtfield PP, Tang K, Mostov KE. The polymeric immunoglobulin receptor. A model protein to study transcytosis. *J. Clin. Invest.* 1991;87:1877.
- [22] Mostov KE, Friedlander M, Blobel G. The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature* 1984;308:37.
- [23] Kaetzel CS, Robinson JK, Chintalacharuvu KR, Vaerman JP, Lamm ME. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: A local defense function for IgA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88:8796.
- [24] Peppard JV, Orlans E, Andrew E, Payne AWR. Elimination into bile of circulating antigen by endogenous IgA antibody in rats. *Immunology* 1982;45:467.

- [25] Perez JH, Wight DGD, Wyatt JJ, van Schaik M, Mullock BM, Luzio JP. The polymeric immunoglobulin A receptor is present on hepatocytes in human liver. *Immunology* 1989;68:474.
- [26] Tanabe T, Pricer WE, Ashwell G. Subcellular membrane topology and turnover of a rat hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.* 1979;254:1038.
- [27] Schwartz AL, Fridovich SE, Knowles BB, Lodish HF. Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. *J. Biol. Chem.* 1981;256:8878.
- [28] Spiess M, Lodish HF. Sequence of a second human asialoglycoprotein receptor: conservation of two receptor genes during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985;82:6465.
- [29] Stockert RJ, Kressner MS, Collins JC, Sternlieb I, Morell AG. IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982;79:6229.
- [30] Tomana M, Kulhavy R, Mestecky J. Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin A by human liver. *Gastroenterology* 1988;94:762.
- [31] Schiff JM, Fisher MM, Jones AL, Underdown BJ. Human IgA as a heterovalent ligand: switching from the asialoglycoprotein receptor to secretory component during transport across the rat hepatocyte. *J. Cell Biol.* 1986;102:920.
- [32] Gorter A, Hiemstra PS, van der Voort EAM, van Es LA, Daha MR. Binding of human IgA1 to rat peritoneal macrophages. *Immunology* 1988;64:207.
- [33] Gorter A, Hiemstra PS, Klar-Mohamad N, van Es LA, Daha MR. Binding, internalization and degradation of soluble aggregates of human secretory IgA by resident rat peritoneal macrophages. *Immunology* 1988;64:703.
- [34] Robinson G, Volovitz B, Passwell JH. Identification of a secretory IgA receptor on breast-milk macrophages: evidence for specific activation via these receptors. *Pediatr. Res.* 1991;29:429.
- [35] Bezouska K, Táboršký O, Kubrycht J, Pospíšil M, Kocourek J. Carbohydrate-structure-dependent recognition of desialylated serum glycoproteins in the liver and leucocytes. *Biochem. J.* 1985;227:345.

- [36] Roque-Barreira MC, Campos-Neto A. Jacalin: an IgA-binding lectin. *J. Immunol.* 1985;134:1740.
- [37] Unkeless JC, Boros P, Fein M. Structure and function of Fc γ R. En *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Ed. JI Gallin, IM Goldstein, R. Snyderman. Raven Press, Ltd., New York. 1992, pp497.
- [38] van de Winkel JGJ, Capel PJA. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol. Today* 1993;14:215.
- [39] Fanger MW, Shen L, Pugh J, Bernier GM. Subpopulation of human peripheral granulocytes and monocytes express receptors for IgA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980;77:3640.
- [40] Fanger MW, Goldstine SN, Shen L. Cytofluorographic analysis of receptors for IgA on human polymorphonuclear cells and monocytes, and the correlation of receptor expression with phagocytosis. *Mol. Immunol.* 1983;20:1019.
- [41] Weisbart RH, Kacena A, Schuh A, Golde DW. GM-CSF induces human neutrophil IgA-mediated phagocytosis by an IgA Fc receptor activation mechanism. *Nature* 1988;332:647.
- [42] Albrechtsen M, Yeaman GR, Kerr MA. Characterization of the IgA receptor from human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1988;64:201.
- [43] Mazengera RL, Kerr MA. The specificity of the IgA receptor purified from human neutrophils. *Biochem. J.* 1990;272:159.
- [44] Monteiro RC, Cooper MD, Kubagawa H. Molecular heterogeneity of Fc α receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1992;148:1764.
- [45] Yeaman GR, Kerr Ma. Opsonization of yeast by human serum IgA anti-mannan antibodies and phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 1987;68:200.
- [46] Henson PM, Johnson HB, Spiegelberg HL. The release of granule enzymes from human neutrophils stimulated by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses. *J. Immunol.* 1972;109:1182.

- [47] Stewart WW, Kerr MA. The specificity of the human neutrophil IgA receptor (Fc α R) determined by measurement of chemiluminescence induced by serum or secretory IgA1 or IgA2. *Immunology* 1990;71:328.
- [48] Hernando P, Egido J, de Nicolás R, González E. IgA immune aggregates stimulate platelet-activating factor and superoxide anion production by human neutrophils. A comparison with IgG aggregates. *Lipids* 1991;26:1231.
- [49] Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA, Gleigh GJ. IgA-induced eosinophil degranulation. *J. Immunol.* 1989;142:2393.
- [50] Monteiro RC, Hostoffer RW, Cooper MD, Bonner JR, Gartland GL, Kubagawa H. Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. *J. Clin. Invest.* 1993;92:1681.
- [51] Maliszewski CR, Shen L, Fanger MW. The expression of receptors for IgA on human monocytes and calcitriol-treated HL-60 cells. *J. Immunol.* 1985;135:3878.
- [52] Chevaillier A, Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Immunofluorescence analysis of IgA binding by human mononuclear cells in blood and lymphoid tissue. *J. Immunol.* 1989;142:2244.
- [53] Padeh S, Jaffe CL, Paswell JH. Activation of human monocytes via their sIgA receptors. *Immunology* 1991;72:188.
- [54] Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc α receptor in humans. *J. Exp. Med.* 1990;171:597.
- [55] Maliszewski CR, March CJ, Schoenborn MA, Gimpel S, Shen L. Expression of a human Fc receptor for IgA. *J. Exp. Med.* 1990;172:1665.
- [56] Gauldie J, Richards C, Lamontagne L. Fc receptors for IgA and other immunoglobulins on resident and activated alveolar macrophages. *Mol. Immunol.* 1983;20:1029.
- [57] Park E, Itatani CA. Detection of Fc receptors for IgA on rat alveolar and peritoneal macrophages. *Cell. Immunol.* 1992;142:225.

- [58] Mota G, Moraru I Jr, Nicolae M, Moraru I. The Fc receptor for IgA expression and affinity on lymphocytes and macrophages. *Mol. Immunol.* 1988;25:95.
- [59] Fargeas CA, Scholler M, Pini A, Wachsmann D, Poindron P, Klein JP. Purification and partial characterization of rat macrophage Fc receptor and binding factor for IgA. *Biochim. Biophys. Acta* 1990;1037:344.
- [60] Shen L, Collins J. Monocyte superoxide secretion triggered by human IgA. *Immunology* 1989;68:491.
- [61] Egidio J, Sancho J, Rivera F, Sánchez-Crespo M. Handling of soluble IgA aggregates by the monocuclear phagocytic system in mice. A comparison with IgG aggregates. *Immunology* 1982;46:1.
- [62] Ferreri NR, Howland WC, Spiegelbreg HL. Release of leukotrienes C₄ and B₄ and prostaglandin E₂ from human monocytes stimulated with aggregated IgG, IgA, and IgE. *J. Immunol.* 1986;136:4188.
- [63] Chantry D, Winearls CG, Maine RN, Feldman M. Mechanism of immune complex-mediated damage: induction of interleukin 1 by immune complexes and synergy with interferon- γ and tumor necrosis factor α . *Eur. J. Immunol.* 1989;19:189.
- [64] Levy-Polat G, Laufer J, Fabian I, Passwell JH. Cross-linking of monocyte plasma membrane Fc α , Fc γ or mannose receptors induces TNF production. *Immunology* 1993;80:287.
- [65] Sancho J, González E, Rivera F, Escanero JF, Egidio J. Hepatic and kidney uptake of soluble monomeric and polymeric IgA aggregates. *Immunology* 1984;52:161.
- [66] Sancho J, González E, Egidio J. The importance of the Fc receptors for IgA in the recognition of IgA by mouse liver cells: its comparison with carbohydrate and secretory component receptors. *Immunology* 1986;57:37.
- [67] Rifai A, Mannik M. Clearance of circulating IgA immune complexes is mediated by a specific receptor on Kupffer cells in mice. *J. Exp. Med.* 1984;160:125.
- [68] Tsujimura K, Park YH, Miyama-Inaba M, Meguro T, Ohno T, Ueda M, Masuda T. Comparative studies on FcR (FcRII, FcRIII, and FcR α) functions of murine B cells. *J. Immunol.* 1990;144:4571.

- [69] Sandor M, Waldschmidt TJ, Williams KR, Lynch RG. IgA-induced avidity maturation of IgA Fc receptors on murine T lymphocytes. *J. Immunol.* 1990;144:4562.
- [70] Millet I, Brière F, Vincent C, Rousset F, Andreoni C, de Vries JE, Revillard JP. Spontaneous expression of a low affinity Fc receptor for IgA (Fc α R) on human B cell lines. *Clin. Exp. Immunol.* 1989;76:268.
- [71] Rao TD, Maghazachi AA, González AV, Phillips-Quagliata JMP. A novel IgA receptor expressed on a murine B cell lymphoma. *J. Immunol.* 1992;149:143.
- [72] Noro N, Adachi M, Yasuda K, Masuda T, Yodoi J. Murine IgA binding factors (IgA-BF) suppressing IgA production: characterization and target specificity of IgA-BF. *J. Immunol.* 1986;136:2910.
- [73] Åkerström B, Lindqvist A, Lindahl G. Binding properties of protein ARP, a bacterial IgA-receptor. *Mol. Immunol.* 1991;28:349.
- [74] Fischetti VA. Streptococcal M protein: molecular design and biological behaviour. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989;2:285.
- [75] Hedén LO, Frithz E, Lindahl G. Molecular characterization of an IgA receptor from group B streptococci: sequence of the gene, identification of a proline-rich region with unique structure and isolation of N-terminal fragments with IgA-binding capacity. *Eur. J. Immunol.* 1991;21:1481.
- [76] Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I. The progression of renal disease. *New. Eng. J. Med.* 1988;318:1657.
- [77] Menè P, Simonson MS, Dunn MJ. Physiology of the mesangial cell. *Physiol. Rev.* 1989;69:1347.
- [78] Tisher CC, Madsen KM. Anatomy of the kidney. En: *The kidney*, vol I. BM Brenner, FC Rector eds. 1991 pp3.
- [79] Kreisberg JJ, Venkatachalam M, Troyer D. Contractile properties of cultured glomerular mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 1985;249:F457.
- [80] Brennan DC, Jevnikar AM, Takei F, Kelley VE. Mesangial cell accessory functions: Mediation by intracellular adhesion molecule-1. *Kidney Int.* 1990;38:1039.

- [81] Baud L, Hagege J, Sraer J, Rondeau E, Perez J, Ardaillou R. Reactive oxygen production by cultured rat glomerular mesangial cells during phagocytosis is associated with stimulation of lipooxygenase activity. *J. Exp. Med.* 1983;158:1836.
- [82] Lovett DH, Sterzel RB, Kashgarian M, Ryan L. Neutral proteinase activity produced *in vitro* by cells of the glomerular mesangium. *Kidney Int.* 1983;23:342.
- [83] Schreiner GF, Cotran RS. Localization of an Ia-bearing cell in the mesangium. *J. Cell Biol.* 1982;94:483.
- [84] Olivetti G, Anversa P, Melissari M, Loud A. Morphometry of the renal corpuscle during postnatal growth and compensatory hypertrophy. *Kidney Int.* 1980;17:438.
- [85] Sakai T, Kriz W. The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. *Anat. Embryol.* 1987;176:373.
- [86] Timpl R. Recent advances in the biochemistry of glomerular basement membrane. *Kidney Int.* 1986;30:293.
- [87] Brown DM, Michael AF, Oegema TR. Glycosaminoglycan synthesis by glomeruli *in vivo* and *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* 1981;674:96.
- [88] Courtoy PJ, Timpl R, Farquhar MG. Comparative distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the rat kidney cortex. *J. Histochem. Cytochem.* 1982;30:874.
- [89] Schlondorff D. The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J.* 1987;1:272.
- [90] Veis JH. An overview of mesangial cell biology. *Contrib. Nephrol.* 1993;104:115.
- [91] Singhal PC, Ding G, DeCandido S, Franki N, Hays RM, Schlondorff D. Endocytosis by cultured mesangial cells and associated changes in prostaglandin E₂ synthesis. *Am. J. Physiol.* 1987;252:F627.
- [92] Santiago A, Satriano J, DeCandido S, Holthofer H, Schreiber R, Unkeless, Schlondorff. A specific Fc γ receptor on cultured rat mesangial cells. *J. Immunol.* 1989;143:2575.

- [93] Sedor JR, Carey SW, Emancipator SN. Immune complexes bind to cultured rat glomerular mesangial cells to stimulate superoxide release: evidence for an Fc receptor. *J. Immunol.* 1987;138:3751.
- [94] van den Dobbelaert MEA, van der Woude FJ, Schroeijers WEM, van Es LA, Daha MR. Soluble aggregates of IgG and immune complexes enhance IL-6 production by renal mesangial cells. *Kidney Int.* 1993;43:544.
- [95] Santiago A, Mori T, Satriano J, Schlondorff D. Regulation of Fc receptors for IgG on cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* 1991;39:87.
- [96] Singhal PC, Santiago A, Satriano J, Hays RM, Schlondorff D. Effects of vasoactive agents on uptake of immunoglobulin G complexes by mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 1990;258:F589.
- [97] Singhal PC, Pan C, Gibbons N. Effect of morphine on uptake of immunoglobulin G complexes by mesangial cells and macrophages. *Am. J. Physiol.* 1993;264:F859.
- [98] Neuwirth R, Singhal P, Diamond B, Hays RM, Lobmeyer L, Clay K, Schlondorff D. Evidence for immunoglobulin Fc receptor-mediated prostaglandin₂ and platelet-activating factor formation by cultured rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 1988;82:936.
- [99] Satriano JA, Schuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D. Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor- α and immunoglobulin G. *J. Clin. Invest.* 1993;92:1564.
- [100] Matsumoto K, Hatano M. Soluble immune complexes stimulate production of interleukin-1 by cultured rat glomerular mesangial cells. *Am. J. Nephrol.* 1991;11:138.
- [101] Knauss TC, Menè P, Ricatani SA, Kester M, Dubyak GR, Emancipator SN, Sedor JR. Immune complex activation of rat glomerular mesangial cells: dependence on the Fc region of antibody. *Am. J. Physiol.* 1989;257:F478.
- [102] Floege J, Topley N, Resch K. Regulation of mesangial cell proliferation. *Am. J. Kidney Dis.* 1991;17:673.
- [103] Floege J, Eng E, Young BA, Johnson RJ. Factors involved in the regulation of mesangial cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Kidney Int.* 1993;43:S47.

- [104] Kashgarian M, Sterzel RB. The pathobiology of the mesangium. *Kidney Int.* 1992;41:524.
- [105] Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, Weber M, Goodman SL. Interactions between glomerular mesangial cells, cytokines and extracellular matrix. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1992;2:126.
- [106] Menè P, Cinotti GA, Pugliese F. Signal transduction in mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1992;2:S100.
- [107] Michael AF, Keane WF, Raij L, Vernier RL, Mauer SM. The glomerular mesangium. *Kidney Int.* 1980;17:141.
- [108] Kashgarian M. Mesangium and glomerular disease. *Lab. Invest.* 1985;52:569.
- [109] Sterzel RB, Lovett DH. Interactions of inflammatory and glomerular cells in the response to glomerular injury. En *Immunopathology of renal disease*. Ed: CB Wilson, New York, Churchill Livinstone. 1988, pp137.
- [110] Yamamoto T, Wilson CB. Quantitative and qualitative studies of antibody-induced mesangial cell damage in the rat. *Kidney Int.* 1987;32:514.
- [111] van den Wall Bake AWL. Mechanisms of IgA deposition in the mesangium. *Contrib. Nephrol.* 1993;104:138.
- [112] Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, Marx M. Cytokines and mesangial cells. *Kidney Int.* 1993;43:S26.
- [113] Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF. A primary mediator of the host response. *Ann. Rev. Immunol.* 1989;7:625.
- [114] Balkwill F. Cytokines: soluble factors in immune responses. *Curr. Op. Immunol.* 1988;1:241.
- [115] Nathan C, Sporn MB. Cytokines in context. *J. Cell Biol.* 1991;113:981.
- [116] Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN. Human tumor necrosis factor: production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 1985;260:2345.

- [117] Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA, Goeddel DV. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985;82:6060.
- [118] Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988;53:45.
- [119] Henter JL, Soder O, Andersson U. Identification of individual tumor necrosis factor/cachectin-producing cells after lipopolysaccharide induction. *Eur. J. Immunol.* 1988;18:983.
- [120] Alonso JL. La compleja fisiología del factor de necrosis tumoral. *Immunología* 1989;8:73.
- [121] Debets JMH, van der Linden CJ, Dieteren EEM, Leeuwenberg JFM, Buurman WA. Fc-receptor cross-linking induces rapid secretion of tumor necrosis factor (cachectin) by human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 1988;141:1197.
- [122] Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986;232:977.
- [123] Jäättelä M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor- α /cachectin. *Lab. Invest.* 1991;64:724.
- [124] Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J. Biol. Chem.* 1991;66:7313.
- [125] Baud L, Fouqueray B, Phillippe C, Amrani A. Tumor necrosis factor alpha and mesangial cells. *Kidney Int.* 1992;41:600.
- [126] Egidio J, Gómez-Chiarri M, Ortíz A, Bustos C, Alonso J, Gómez-Guerrero C, Gómez-Garre D, López-Armada MJ, Plaza J, González E. Role of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of glomerular diseases. *Kidney Int.* 1993;43:S59.
- [127] Baud L, Oudinet JP, Bens M, Noe L, Peraldi MN, Rondeau E, Etienne J, Ardaillou R. Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. *Kidney Int.* 1989;35:1111.

- [128] Amore A, Cavallo F, Bocchietto E, Bussolino F, Gianoglio B, Peruzzi L, Porcellini MG, Coppo R. Cytokine mRNA expression by cultured rat mesangial cells after contact with enviromental lectins. *Kidney Int.* 1993;43:S41.
- [129] Affres H, Pérez J, Hagege J, Fouqueray B, Kornprobst M, Ardaillou R, Baud L. Desferrioxamine regulates tumor necrosis factor release in mesangial cells. *Kidney Int.* 1991;39:822.
- [130] Camussi G, Turello E, Tetta C, Bussolino F, Baglione C. Tumor necrosis factor induces contraction of mesangial cells and alter their cytoskeletons. *Kidney Int.* 1990;38:795.
- [131] Silver BJ, Jaffer FE, Abboud HE. Platelet-derived growth factor synthesis in mesangial cells: induction by multiple peptide mitogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86:1056.
- [132] Zoja C, Wang JM, Bettoni S, Sinori M, Renzi D, Chiaffarino F, Abboud HE, Van Damme J, Mantovani A, Remuzzi G, Rambaldi A. Interleukin- 1β and tumor necrosis factor- α induce gene expression and production of leukocyte chemotactic factors, colony-stimulating factors, and interleukin-6 in human mesangial cells. *Am. J. Pathol.* 1991;138:991.
- [133] Pirotzky A, Delattre RM, Hellegouarch A, Lonchampt MO, Aarden L, Braquet P, Galanaud P. Interleukin-6 production by tumor necrosis factor and lipopolysaccharide stimulated rat renal cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1990;56:271.
- [134] Kusner DJ, Luebbers EL, Nowinski RJ, Konieczkowski M, King CH, Sedor JR. Cytokine and LPS-induced synthesis of interleukin-8 from human mesangial cells. *Kidney Int.* 1991;39:1240.
- [135] Pfeilschifter J, Pignat W, Vosbeck K, Märki F. Interleukin 1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate prostaglandin synthesis and phospholipase A2 release from renal mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989;159:385.
- [136] Ortiz A, Gómez-Chiarri M, Alonso J, Bustos C, Gómez-Guerrero C, López-Armada MJ, Gómez-Garre D, Palacios I, Ruiz-Ortega M, Gutierrez S, González E, Egido J. The potencial role of inflammatory and fibrogenic cytokines in the glomerular diseases. *J. Lipid Mediat.* 1994;9:55.

- [137] Arimura Y, Minoshima S, Kamiya Y, Nakabayashi K, Kitamoto K, Nagasawa T, Suzuki K. Pathogenesis of anti-myeloperoxidase antibodies related crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1991;2:262(A).
- [138] Bustos C, González E, Muley R, Alonso JL, Egido J. Increase of TNF α synthesis and gene expression in peripheral blood mononuclear cells of children with idiopathic nephrotic syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* 1994 (en prensa).
- [139] Ortiz A, Gómez-Chiarri M, Quirós J, López-Armada MJ, Alonso J, González E, Egido J. Exogenous fibronectin modifies tumor necrosis factor and fibronectin gene expression and catabolism of immune complexes in proliferative glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1992;7:676(A).
- [140] Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol. Today* 1990;11:443.
- [141] Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989;74:1.
- [142] Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta2) receptor. *Science* 1988;241:825.
- [143] Northemann W, Braciak TA, Hattori M, Lee F, Fey GH. Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *J. Biol. Chem.* 1989;264:16072.
- [144] Coleman DL, Ruef C. Interleukin-6: an autocrine regulator of mesangial cell growth. *Kidney Int.* 1992;41:604.
- [145] Bauer J, Ganter U, Geiger T, Jacobshagen U, Hirano T, Matsuda T, Kishimoto T, Andus T, Acs G, Gerok W, Ciliberto G. Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Blood* 1988;72:1134.
- [146] Helfgott DC, May LT, Stoege Z, Tamm I, Sehgal PB. Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of Beta 2 Interferon by human fibroblasts. *J. Exp. Med.* 1987;166:1300.
- [147] Riedy MC, Stewart CC. Inhibitory role of interleukin-6 in macrophage proliferation. *J. Leuk. Biol.* 1992;52:125.

- [148] Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi ES, Remick D, Castillo J. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibits acute inflammation. *Am. J. Pathol.* 1991;138:1097.
- [149] Abbot F, Ryan JJ, Ceska M, Matsushima K, Sarraf CE, Rees AJ. Interleukin-1 β stimulates human mesangial cells to synthesize and release interleukins-6 and -8. *Kidney Int.* 1991;40:597.
- [150] Ruef C, Budde K, Lacy J, Northemann W, Baumann M, Sterzel RB, Coleman DL. Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney Int.* 1990;38:249.
- [151] Ruef C, Kashgarian M, Coleman DL. Mesangial cell-matrix interactions. Effects on mesangial cell growth and cytokine secretion. *Am. J. Pathol.* 1992;141:429.
- [152] Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, Matsuda T, Hirayama T, Yamada H, Fujii Y, Dohi K, Ishikawa H, Ohmoto Y, Yoshizaki K, Hirano T, Kishimoto T. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.* 1989;143:3949.
- [153] Ikeda M, Ikeda U, Ohara T, Kusano E, Kano S. Recombinant interleukin-6 inhibits the growth of rat mesangial cells in culture. *Am. J. Pathol.* 1992;141:327.
- [154] Suematsu S, Matsuda T, Aozasa K, Akira S, Nakano N, Ohno S, Miyazaki JI, Yamamura KI, Hirano T, Kishimoto T. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86:7547.
- [155] Fukatsu A, Matsuo S, Tamai H, Sakamoto N, Matsuda T, Hirano T. Distribution of interleukin-6 in normal and diseased human kidney. *Lab. Invest.* 1991;65:61.
- [156] Egido J. Nefropatía IgA. *Medicina clínica* 1985;85:759.
- [157] Berger J, Hinglais N. Les depots intercapillaires d'IgA-IgG. *J. Urol. Nephrol.* 1968;74:694.
- [158] Emancipator SN, Gallo GR, Lamm ME. IgA nephropathy: perspectives on pathogenesis and clasification. *Clin. Nephrol.* 1985;24:161.
- [159] Hernando P, Egido J, de Nicolás R, Sancho J. Clinical significance of polymeric and monomeric IgA complexes in patients with IgA nephropathy. *Am. J. Clin. Dis.* 1986;8:410.

- [160] Kurt SM, Rau VM, Franklin WA. IgA nephropathy morphologic predictors of progressive renal disease. *Hum. Pathol.* 1982;13:314.
- [161] Valentijn R, Radl J, Haaijman J, Vermmer B, Weening J, Kauffmann RH, Daha MR, van Es LA. Circulating and mesangial secretory component-binding IgA1 in primary IgA nephropathy. *Kidney Int.* 1984;26:760.
- [162] van der Wall Bake AWL, Bruijn JA, Accavitti MA, Crowley-Nowick PA, Schrohenloher RE, Julian BA, Jackson S, Kibagawa H, Cooper MD, Daha MR, Mestecky J. Shared idiotypes in mesangial deposits in IgA nephropathy are not disease-specific. *Kidney Int.* 1993;44:65.
- [163] Lai KN. The cellular immunity and nature of IgA molecules in IgA nephropathy. *Contib. Nephrol.* 1993;104:99.
- [164] Egido J, Sancho J, Mampaso F, López-Trascasa M, Sánchez-Crespo M, Blasco R, Hernando L. A possible common pathogenesis of the mesangial IgA glomerulonephritis in patients with Berger's disease and Schönlein-Henoch syndrome. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* 1980;17:660.
- [165] Bené MC, Faure G, Duheille J. IgA nephropathy: characterization of the polymeric nature of mesangial deposits by *in vitro* binding of free secretory component. *Clin. Exp. Immunol.* 1982;47:527.
- [166] Mestecky J, Tomana M, Czerkinsky C, Tarkowski S, Matsuda S, Waldo FB, Moldoveanu Z, Julian BA, Galla JH, Russell MW, Jackson S. IgA-associated renal diseases: immunochemical studies of IgA1 proteins, circulating immune complexes, and cellular interactions. *Semin. Nephrol.* 1987;7:332.
- [167] López-Trascasa M, Egido J, Sancho J, Hernando L. IgA glomerulonephritis (Berger's disease): Evidence of high serum levels of polymeric IgA. *Clin. Exp. Immunol.* 1987;42:247.
- [168] Mestecky J, Tomana M, Crowley-Nowick PA, Moldoveanu Z, Julian BA, Jackson S. Defective galactosylation and clearance of IgA1 molecules as a possible etiopathogenic factor in IgA nephropathy. *Contib. Nephrol.* 1993;104:172.
- [169] Emancipator SN, Gallo GR, Lamm ME. Animal models of IgA nephropathy. En *IgA nephropathy*. Ed AR Clarkson. Boston, Nijhoff. 1987, pp188.

- [170] Schena FP, Gesualdo L, Montinaro V. Immunopathological aspects of immunoglobulin A nephropathy and other mesangial proliferative glomerulonephritides. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1992;2:S167.
- [171] Coppo R, Amore A, Gianoglio B, Reyna A, Peruzzi L, Roccatello D, Alessi D, Sena LM. Serum IgA and macromolecular IgA reacting with mesangial matrix components. *Contrib. Nephrol.* 1993;104:162.
- [172] González E, Hernando P, de Nicolás R, Egido J. Release of PAF and oxygen radicals by human neutrophils and rat mesangial cells stimulated with IgA and IgG immune aggregates. *Adv. Mucosal Immunol.* Ed: T MacDonald. Kleiner Academic Publishers 1990, pp445.
- [173] Rifai A, Chen A, Imai H. Complement activation in experimental IgA nephropathy: an antigen-mediated process. *Kidney Int.* 1987;32:838.
- [174] Amore A, Emancipator SN, Roccatello D, Gianoglio B, Peruzzi L, Porcellini MG, Piccoli G, Coppo R. Functional consequences of the binding of gliadin to cultured rat mesangial cells: bridging immunoglobulin A to cells and modulation of eicosanoids synthesis and altered cytokine production. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1994;23:290.
- [175] Davin JC, Li Vecchi M, Nagy J, Foidart JM, Foidart JB, Barbagallo Sangioirgi G, Malaise M, Mahieu P. Evidence that the interaction between circulating IgA and fibronectin is a normal process enhanced in primary IgA nephropathy. *J. Clin. Immunol.* 1991;11:78.
- [176] van der Wall Bake AWL, Kirk KA, Gay RE, Switalski LM, Julian B, Jackson S, Gay S, Mestecky J. Binding of serum immunoglobulins to collagens in IgA nephropathy and HIV infection. *Kidney Int.* 1992;42:374.
- [177] Gesualdo L, Pinzani M, Floriano JJ. Platelet-derived growth factor expression in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 1991;65:160.
- [178] Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β 1. *Nature* 1990;346:371.
- [179] Montinaro V, Hevey K, Aventaggiato L, Fadden K, Esparza A, Chen A, Finbloom DS, Brunda M, Rifai A. Extrarenal cytokines modulate the glomerular response to IgA immune complexes. *Kidney Int.* 1992;42:341.

- [180] Kreisberg JJ, Karnovsky MJ. Glomerular cells in culture. *Kidney Int.* 1983;23:439.
- [181] Ouchterlony O. *In vitro* method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1948;25:186.
- [182] Grabar P, Williams CA. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta* 1953;10:193.
- [183] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 1970;227:680.
- [184] Merril CR, Goldman D, Van Keuren ML. Gel protein stains: silver stains. *Methods Enzymol.* 1984;104:441.
- [185] Cambiaso CL, Goffinet A, Vaerman JP, Heremans JF. Glutaraldehyde-activated aminohexyl-derivative of Sepharose 4B as a new versatile immunoabsorbent. *Immunochemistry* 1975;12:273.
- [186] Greenwood FC, Hunter WM. The preparation of [¹²⁵I] labelled human growth hormone of high specific activity. *Biochem. J.* 1963;89:114.
- [187] McConahey PJ, Dixon FJ. A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1966;29:185.
- [188] Hudson L, Hay FC. *Practical Immunology*. Blackwell Scientific Publications, London. 1989.
- [189] Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.* 1961;81:384.
- [190] Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* 1949;51:660.
- [191] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- [192] Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156.

- [193] Menè P, Abboud HE, Dubyak G, Scarpa A, Dunn MJ. Effects of PDGF on inositol phosphates, cytosolic calcium and contraction of mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 1987;253:F458.
- [194] López-Farré A, Riesco A, Moliz M, Egido J, Casado L, Hernando L, Caramelo C. Inhibition by L-arginine of the endothelin-mediated increase in cytosolic calcium in human. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;178:884.
- [195] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.* 1985;260:3440.
- [196] Lowry O, Rosebrough NS, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;142:265.
- [197] Mathews N, Neale ML. Cytotoxicity assays for tumor necrosis factor and lymphotoxin. En *Lymphokines and interferons*. Ed: MJ Clemens, AG Morris, AJH Gearing, IRL press, Oxford. 1987, pp221.
- [198] Aarden LA, Groot Er, Schaap OL, Lansdorp PM. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 1987;17:1411.
- [199] Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ. A rapid and convenient assay for counting cells cultures in microwell plates: Application for assessment of growth factors. *J. Cell Sci.* 1989;92:513.
- [200] Knutson DW, Kijlstra A, van Es LA. Association and dissociation of aggregated IgG from rat peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 1977;145:1368.
- [201] Rasmussen JM, Brandslund I, Leslie RGQ, Svegag SE. Quantitative studies of Fc receptors on human monocytes: characterization by binding of homologous and heterologous monomeric IgG and soluble immune complexes of different composition. *Immunology* 1983;49:537.
- [202] Ratcliffe A, Stanworth DR. The localization of the binding site(s) on human IgG1 for the Fc receptors on homologous monocytes and heterologous mouse macrophages. *Immunology* 1983;50:93.

- [203] Shen L, Lasser R, Fanger MW. My 43, a monoclonal antibody that reacts with human myeloid cells inhibits monocyte IgA binding and triggers function. *J. Immunol.* 1989;143:4117.
- [204] Shen L, Maliszewski CR, Rigby WF, Fanger MW. IgA-mediated effector function of HL-60 cells following treatment with calcitriol. *Mol. Immunol.* 1986;23:611.
- [205] Mellman I, Plutner H. Internalization and degradation of macrophage Fc receptors bound to polyvalent immune complexes. *J. Cell. Biol.* 1984;98:1170.
- [206] Kijlstra A, van Es LA, Daha MR. The role of complement in the binding and degradation of immunoglobulin aggregates by macrophages. *J. Immunol.* 1979;123:2488.
- [207] Simonson MS, Wann S, Menè P, Dubyak GR, Kester M, Nakazato Y, Sedor JR, Dunn MJ. Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 1989;83:708.
- [208] Gergely J, Sarmay G. The two binding-site models of human IgG binding Fc γ receptors. *FASEB J.* 1990;4:3275.
- [209] Canfield SM, Morrison SL. The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the C_H2 domain and is modulated by the hinge region. *J. Exp. Med.* 1991;173:1483.
- [210] Metzger H, Kinet JP. How antibodies work: focus on Fc receptors. *FASEB J.* 1988;2:3.
- [211] Aramaki Y, Murai M, Tsuchiya S. Contribution of N-acetyl- β -D-galactosamine-specific lectin to Fc receptor mediated phagocytosis by mouse peritoneal macrophages. *Immunology* 1993;79:403.
- [212] Allen AC, Harper SJ, Layward L, Feehally J. Increased O-linked N-acetyl galactosamine in the hinge region of IgA1 in IgA nephropathy. *IgA Nephropathy International Symposium* 1994, 8(A).
- [213] Rodriguez-Iturbe B, Katiyar V, Coello J. Neuraminidase activity and free sialic acid levels in the serum of patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis. *New Engl. J. Med.* 1981;304:1506.

- [214] McIntosh RM, Kaufman DB, McIntosh JR, Griswold W. Glomerular lesions produced by autologous serum and autologous IgG modified by treatment with a culture of a β -haemolytic streptococcus. *J. Med. Microbiol.* 1972;5:1.
- [215] Steciwko A, Szewczyk Z, Koninski P, Karkoszka R, Myszka K, Józwiak M, Nestorowicz M, Steciwko M. Neuraminidase-IgA nephropathy. Experimental model. *IgA Nephropathy International Symposium* 1994, 48(A).
- [216] Daha MR, van Es LA. Fc- and complement receptor-dependent degradation of soluble immune complexes and stable immunoglobulin aggregates by guinea pig monocytes, peritoneal macrophages and Kupffer cells. *J. Leukoc. Biol.* 1984;36:569.
- [217] Jones DH, Nusbacher J, Anderson CL. Fc receptor-mediated binding and endocytosis by human mononuclear phagocytes: monomeric IgG is not endocytosed by U937 cells and monocytes. *J. Cell Biol.* 1985;100:558.
- [218] Young JDE, Ko SS, Cohn Z. The increase in intracellular free calcium associated with IgG γ 2b/ γ 1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984;81:5430.
- [219] Di Virgilio F, Meyer BC, Greenberg S, Silverstein S. Fc receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low cytosolic Ca^{2+} levels. *J. Cell Biol.* 1988;106:657.
- [220] Leslie RGQ, Coupland K. The ingestion and degradation of soluble immune complexes by guinea-pig macrophages and neutrophils. *Immunology* 1985;54:811.
- [221] Yoshikawa N, Iijima K, Matsuyama S. Repeat renal biopsy in children with IgA nephropathy. *Clin. Nephrol.* 1990;33:160.
- [222] Simon P, Ramee MP, Grünfeld JP, Droz D, Grateau G, Cam G, Ang KS. Disappearance of mesangial IgA deposits in acute poststreptococcal glomerulonephritis superimposed on IgA nephropathy. *Kidney Int.* 1985;28:873(A).
- [223] Tsunoda Y. Receptor-operated Ca^{2+} signaling and crosstalk in stimulus secretion coupling. *Biochim. Biophys. Acta* 1993;1154:105.
- [224] Rasmussen H, Barret PQ. Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol. Rev.* 1984;64:938.

- [225] Walker BAM, Hagenlocker BE, Stubbs EB, Sandborg RR, Agranoff BW, Ward P. Signal transduction events and Fc γ R engagement in human neutrophils stimulated with immune complexes. *J. Immunol.* 1991;146:735.
- [226] Rosales C, Brown EJ. Signal transduction by neutrophil immunoglobulin G Fc receptors. Dissociation of intracytoplasmic calcium concentration rise from inositol 1,4,5-triphosphate. *J. Biol. Chem.* 1992;267:5265.
- [227] Tomosugi NI, Cashman SJ, Hay H, Pusey CD, Evans DJ, Shaw A, Rees AJ. Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by bacterial lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and IL-1. *J. Immunol.* 1989;142:3083.
- [228] Kunkel RG, Mulligan MD, Johnson KJ, Riggs LK, Ward PA. Morphologic studies on inhibition of acute glomerulonephritis by anti-TNF antibody. *FASEB J.* 1992;6:1606(A).
- [229] Fujii K, Muller KD, Clarkson AR, Woodroffe AJ. The effect of IgA immune complexes on the proliferation of cultured human mesangial cells. *Am. J. Kidney Dis.* 1990;17:207.
- [230] Radeke HH, Francki A, von der Ohe J, Resch K. The autocrine growth of human glomerular mesangial cells (HMC): role of interleukins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1992;3:611(A).